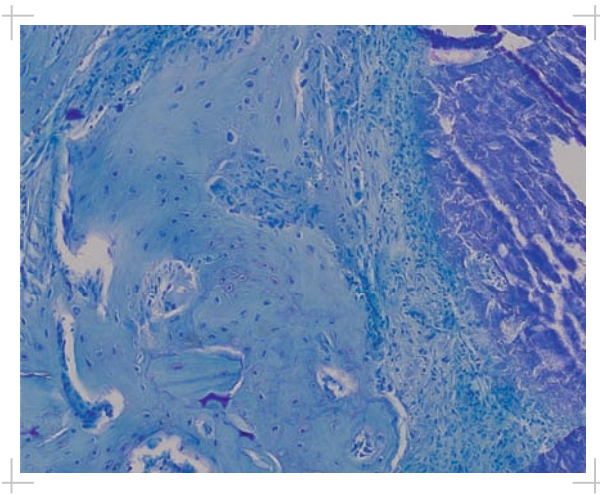


Vera Hanstein

Etablierung eines Operationsmodells und
Untersuchung des Degenerationsverhaltens
eines Silikat-Kollagen-Knochenersatzmaterials
in einem metaphysären Frakturdefekt bei
ovariekтомierten Ratten



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Etablierung eines Operationsmodells und Untersuchung
des Degenerationsverhaltens eines
Silikat-Kollagen-Knochenersatzmaterials in einem
metaphysären Frakturdefekt bei ovariectomierten Ratten**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von:

Vera Hanstein geborene Witt
aus Darmstadt

Gießen 2015

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie
der Justus-Liebig-Universität-Gießen

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Christian Heiß

Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. biol. hom. Volker Alt
Gutachter: Prof. Dr. med. Markus Rickert

Tag der Disputation: 09.05.2016

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Osteoporose	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Epidemiologie	1
1.1.3	Physiologie des Knochens und Pathophysiologie der Osteoporose	2
1.1.4	Osteoporose Tiermodelle	6
1.2	Osteoporotische Frakturen	8
1.2.1	Kennzeichen osteoporotischer Frakturen	8
1.2.2	Fraktur-Modelle bei Osteoporose	9
1.3	Biomaterialien zur Stimulation der Knochenheilung	12
1.3.1	Definition von Biomaterialien	12
1.3.2	Mechanismen der Knochenneubildung	12
1.3.2.1	Osteokonduktion	12
1.3.2.2	Osteoinduktion	13
1.3.2.3	Osteogenese	13
1.3.3	Mechanismen der Degradation von Biomaterialien im Knochen	13
1.3.4	Silikat-Kollagen-Zweiphasenverbundwerkstoff	14
1.4	Zielstellung der Arbeit	15
2	MATERIAL UND METHODE	16
2.1	Material	16
2.1.1	Silikat-Kollagen-Zweiphasenverbundwerkstoff	16
2.1.2	Osteosynthesematerialien	17
2.2	Tierversuch	18
2.2.1	Studiendesign und Studienablauf	18
2.2.1.1	Ethikkommissionsvotum	18
2.2.1.2	Versuchstiere	19
2.2.1.3	Versuchstierhaltung und Fütterung	19
2.2.1.4	Narkose	19
2.2.2	OP-Technik	20
2.2.3	Postoperative Beobachtung	22

2.2.4	Postoperative Computer-Tomographie.....	22
2.2.5	Euthanasie der Tiere	22
2.2.6	Makroskopische Auswertung	22
2.2.7	Histologische Auswertung	23
2.2.7.1	Trenn-Dünnschliff-Technik	23
2.2.7.2	Paraffin-Technik	23
2.2.7.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)	24
2.2.7.4	Toluidinblau-Färbung (Tb)	24
2.2.7.5	Immunhistochemische Untersuchungen	25
2.2.7.5.1	Nachweis von tartratresistenter saurer Phosphatase (TRAP)	25
2.2.7.5.2	Nachweis von ED1-positiven Zellen (ED1)	25
3	ERGEBNISSE	27
3.1	Intra- und postoperativer Verlauf	27
3.2	Makroskopische Ergebnisse der Femurexplantation	29
3.3	Radiologische Ergebnisse	34
3.4	Histologische Ergebnisse	36
3.4.1	Histologie Tier 3	36
3.4.1.1	Übersichts- und Detailhistologie Tier 3	36
3.4.1.2	Immunhistologie Tier 3	38
3.4.2	Histologie Tier 8	40
3.4.2.1	Übersichts- und Detailhistologie Tier 8	40
3.4.2.2	Immunhistologie Tier 8	42
3.4.3	Histologie Tier 9	44
3.4.3.1	Übersichts- und Detailhistologie Tier 9	44
3.4.3.2	Immunhistologie Tier 9	46
3.4.4	Histologie Tier 10	48
3.4.4.1	Übersichts- und Detailhistologie Tier 10	48
3.4.4.2	Immunhistologie Tier 10	50
4	DISKUSSION.....	52
4.1	Tiermodell	52
4.2	Operationstechnik	53
4.3	Makroskopische Ergebnisse	54
4.4	Histologische Ergebnisse	55

5	ZUSAMMENFASSUNG	57
6	SUMMARY.....	58
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	59
8	TABELLEN UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	60
8.1	Tabellen.....	60
8.2	Abbildungen	60
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	64
10	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	75
11	ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION	76
12	DANKSAGUNG	77

1 Einleitung

1.1 Osteoporose

1.1.1 Definition

Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird die Osteoporose wie folgt definiert: „Die Osteoporose ist eine Erkrankung, charakterisiert durch eine niedrige Knochenmasse und eine Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes, die zu einer erhöhten Knochenbrüchigkeit und zu einem konsequenten Ansteigen des Frakturrisikos führt“ (World Health Organisation 1994).

Somit ist die Osteoporose als eine Systemerkrankung des Skelettes anzusehen. Hierbei kommt es zum Verlust von Knochenmasse, welches eine Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochens zu Folge hat. Dies wiederum führt zu einem erhöhten Frakturrisiko. Eine Osteoporose ist nach dem Auftreten einer durch Knochenumbauvorgänge bedingten Fraktur als manifest anzusehen (Dachverband Osteologie 2009).

Die Osteoporose wird durch die Ermittlung des T-Wertes der Knochendichte mit Hilfe einer DXA-Messung diagnostiziert. Der T-Wert gibt die Standardabweichung der Knochendichte von der eines gesunden, 30-jährigen Menschen an. Liegt der T-Wert unter -2,5, ist von einer Osteoporose zu sprechen. Liegt der T-Wert zwischen -1 und -2,5, so liegt eine Osteopenie vor. Des Weiteren kann die Osteoporose an Hand des Z-Wertes beurteilt werden. Dieser gibt die Standardabweichung der Knochendichte von einem gleichaltrigen Menschen an. Anhand des T-Wert bzw. des Z-Wertes wird die Indikation zur medikamentösen Behandlung der Osteoporose gestellt (Wüster et al., 1998).

1.1.2 Epidemiologie

Epidemiologisch betrachtet nimmt die Zahl der an Osteoporose erkrankten Menschen stetig zu und damit auch die therapeutischen Kosten, so dass die Weltgesundheitsorganisation (WHO) die Osteoporose mit in die Liste der zehn wichtigsten Erkrankungen aufgenommen hat.

Die Zahl der an Osteoporose erkrankten Menschen lag im Jahre 2003 in Deutschland bei 7,8 Millionen (Häussler, 2007). Dies entsprach fast 10 % der Gesamtbevölkerung in Deutschland. Schätzungsweise kam es bei 335.400 der Erkrankten zu einer durch Osteoporose bedingten Fraktur (Häussler, 2007).

Die Osteoporose und die daraus resultierenden Frakturen belastet vor allem die Menschen jenseits des 50. Lebensjahres (Compston, 2010), so dass aufgrund des demographischen Wandels die Zunahme der Erkrankung zu erklären ist.

Die Osteoporose war lange Zeit ein Problem der westlichen Welt. Sie ist aber bereits in den letzten Jahrzehnten deutlich häufiger in Schwellenländern diagnostiziert worden und wird in Zukunft vor allem ein Thema in Asien werden. Dort werden laut Experten in Zukunft die meisten Schenkelhalsbrüche pro 100.000 Einwohner zu zählen sein (Dhanwal et. al. 2010).

Des Weiteren fällt auf, dass bezüglich der Epidemiologie der Osteoporose Erkrankten in Europa eindeutige geographische Unterschiede festzustellen sind. So besteht zum Beispiel ein Nord-Süd Gefälle. In Schweden und Norwegen sind deutlich mehr auf Osteoporose zurückzuführende Schenkelhalsbrüche zu verzeichnen als in der Schweiz oder in Frankreich (Dhanwal et. al., 2010).

1.1.3 Physiologie des Knochens und Pathophysiologie der Osteoporose

Der Pathophysiologie der Osteoporose liegt ein Ungleichgewicht im Knochenremodelling zu Grunde.

Das Skelett ist ein metabolisch aktives Organ, welches sich im Laufe des Lebens ununterbrochen verändert und erneuert. Dies beinhaltet den Abbau von mineralisiertem Knochen durch Osteoklasten, sowie den Aufbau von neuem Knochengewebe durch Osteoblasten, welche im Anschluss mineralisiert werden (Abbildung 1).

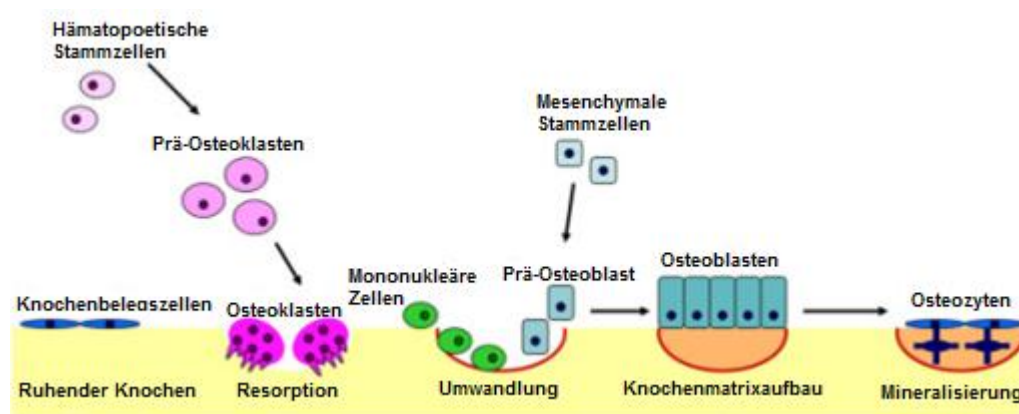


Abbildung 1: Knochenumbau: Osteoklasten resorbieren Knochengewebe und Mineralien. Mononukleäre Zellen wandeln sich in Osteoblasten um, welche neue Knochenmatrix bilden. Die Mineralisierung der Knochenmatrix und die Osteozytenbildung vervollständigen den Remodelingzyklus (aus: Kapinas K, Delany AM 2011).

Der Zyklus des Remodellings besteht aus drei Phasen. Die erste Phase ist die Resorptionsphase, in welcher die Osteoklasten den bestehenden Knochen phagozytieren. Parallel hierzu beginnt die Phase des Wiederaufbaues, indem sich mononukleäre Zellen zu Osteoblasten entwickeln und neue Knochenmatrix aufbauen. Anschließend erfolgt die Mineralisierung der neu gebildeten Knochenmatrix.

Diese drei Phasen sind über eine Reihe von regulierenden Schritten aneinander gekoppelt und regulieren die Abstimmung der Interaktion zwischen der mesenchymalen Osteoblasten-Linie und der hämatopoetischen Osteoklasten-Linie. Die anfängliche Aktivierung findet zwischen Osteoklasten- und Osteoblasten-Vorläuferzellen statt. Dies führt zur Differenzierung, Migration und Fusion der großen mehrkernigen Osteoklasten. Die ausgereiften Osteoklasten setzen sich dann an die mineralisierte Knochenoberfläche und initiieren die Resorption durch Sekretion von Wasserstoffionen und lysosomalen Enzymen wie Cathepsin K, so dass die Knochenmatrix inklusive des Kollagens bei sauren pH-Werten aufgelöst wird. Die Resorption der Knochenmatrix durch Osteoklasten bildet unregelmäßige Hohlräume im trabekulär aufgebauten Knochen. Diese werden als Howship-Lücken oder im kortikalen Knochen als zylindrische Havers-Kanäle bezeichnet (Raisz, 1999).

Sobald die Resorption durch Osteoklasten beendet ist, lagern sich Zellen aus der Familie der Makrophagen an der Knochenoberfläche an. Diese verdauen die noch verbliebenen Kollagene und lagern Proteoglykane an den sogenannten Zementlinien ab. Dadurch wird die Freisetzung von Wachstumsfaktoren induziert und die Phase des Wiederaufbaues eingeleitet. Nun lagern sich in den zuvor entstandenen Hohlräumen mesenchymale Stammzellen in dünnen Schichten an. Diese differenzieren sich zu Osteoblasten und synthetisieren eine mineralisierbare Knochenmatrix (Karsenty, Wagner, 2002). Im weiteren Verlauf mineralisieren ausgereifte Osteoblasten die zuvor gebildete Knochenmatrix. Die Entwicklung der Osteoblasten aus mesenchymalen Stammzellen wird durch verschiedene Faktoren, wie „Runx-related Transcription Factor 2“ (Runx2) (Raggatt, Partridge, 2010) und Zinkfinger beinhaltenden Transkriptionsfaktoren (Maes et al., 2007) getriggert.

Die für das Remodelling zuständigen Zellen werden als „basic multicellular unit“ (BMU) bezeichnet. Die Lebensdauer einer BMU beträgt nur eine einzelne Umbauperiode. Die Zeit für die Osteoklasten vermittelte Resorption beträgt ca. 3 Wochen, während der durch Osteoblasten vermittelte Knochenaufbau 3-4 Monate beträgt. Die Zeiten variieren jedoch stark zwischen trabekulärem und kortikalem Knochen. Trabekulär aufgebauter Knochen ist in seinem Remodelling deutlich schneller als der dichtere kortikale Knochen.

Ob an einer bestimmten Stelle des Knochens ein Remodelling stattfindet, hängt von dessen mechanischer Beanspruchung, der Gewebszerstörung bzw. der Signalauslösung von Zytokinen ab (Henriksen et al., 2006; Hong et al., 2005).

Der Knochenumbau wird dann von Osteoblasten durch die Ausschüttung von RANKL („Receptor Activator of Nuclear Faktor kappa B Ligand“) begonnen (Hong et al., 2005). Beendet wird der Remodellingprozess durch das Stoppen der BMU Einheit durch beispielsweise die Anwesenheit von Östrogenen oder Transforming Growth Faktor-beta, welche in den Osteoklasten eine Apoptose induzieren können (Hughes et Boyce, 1997; Nakamura et al., 2007).

Das Remodelling spielt eine entscheidende Rolle während der physiologischen Wachstumsphase sowie bei der Heilung von Frakturen. So wird beispielsweise im ersten Lebensjahr eines Menschen das gesamte Skelett einmal erneuert. Hingegen wird in einem Lebensjahr eines erwachsenen Menschen das Skelett nur zu 10% erneuert. Entscheidend ist hier, dass das Remodelling des Knochens sich nicht gleichmäßig auf das gesamte Skelett bezieht, sondern trabekulär aufgebauter Knochen zu 20% und kortikaler Knochen nur zu 5% im Jahr erneuert wird (Fernández-Tresguerres-Hermández-Gil et al., 2006). Kommt es also zu einem Ungleichgewicht zwischen Knochenabbau und Knochenaufbau im Metabolismus des Knochens, so zeigen sich die daraus resultierenden Komplikationen vor allem im häufiger umgebauten trabekulären Knochen. Dies ist in der Spongiosa, dem metaphysären Bereichen der langen Röhrenknochen der Fall, so dass in diesen Bereichen osteoporotische Veränderungen verstärkt vorzufinden sind (Wronski, 1985; Peng et al., 1994).

Ein weiterer entscheidender Faktor für die Entstehung von Osteoporose ist neben der ungenügenden Osteoblastenaktivität und der daraus resultierenden Verringerung der Knochendichte durch die Verdünnung der Trabekel, die Veränderung der Architektur der Knochen trabekel (Weinkamer et al., 2005).

Es gehen vor allem horizontal verlaufende Trabekel verloren. Durch die daraus resultierende Veränderung der Statik ist die Belastbarkeit des Knochens um ein Vielfaches verringert, so dass es zu typischen Frakturen kommen kann.

Das Remodelling spielt auch eine wichtige Rolle in der Anpassung und Veränderung der Architektur eines Knochens auf verschiedene mechanische Ansprüche. So wird überflüssiger Knochen entfernt, Mikrofrakturen werden repariert und stark belastete Regionen verstärkt.

Neben der Optimierung der Stützfunktion hat das Remodelling einen entscheidenden Einfluss auf die Calciumhomöostase des Plasmas. Aufgrund dessen steht das Remodelling unter dem Einfluss vom Parathormon sowie Calcitriol und weiteren

Hormonen wie Wachstumshormonen oder Schilddrüsen- und Sexualhormonen. Ebenfalls kann durch Glucocorticoide, insulinähnliche Wachstumsfaktoren, Zytokine, Prostaglandine, Tumorstwachstumsfaktoren und „bone morphogenetic proteins“ auf die Calciumhomoöstatik eingewirkt werden. Daraus resultiert eine entsprechende Beeinflussung des Knochenstoffwechsels.

Aus dem Eingreifen von Sexualhormonen in den Knochenaufbau und Knochenabbau entsteht die häufigste Form der Osteoporose, die postmenopausale Osteoporose. Hierbei kommt es durch die, durch das Patientenalter bedingte verringerte Leistung der Ovarien, zu einer verminderten Östrogen-Ausschüttung. Dies hat zur Folge, dass die Serumkonzentration von 17β -Östradiol nach der Menopause bezogen auf den prämenopausalen Wert um 85-90 % und die Serumkonzentration von Östrogen um 65-75 % sinken (Kohal et. al., 1997).

Beide Hormone sind notwendig für den geregelten Knochenaufbau. Der postmenopausale Einbruch der Hormone führt dementsprechend zu einem eingeschränkten Knochenaufbau. Somit entsteht durch den verminderten Knochenaufbau ein Ungleichgewicht zwischen Knochenabbau und Knochenaufbau mit einem Überhang des Abbaus.

Dieser Problematik steht ein Absicherungsmechanismus gegenüber, welcher den Knochenabbau an den Knochenaufbau bindet und somit einen alleinigen Knochenabbau verhindern soll. Dies ist über die Reaktionskette von RANK/RANKL und OPG zum Teil gewährleistet, so dass nach einer Abbauphase eine Aufbauphase folgt (Abbildung 2).

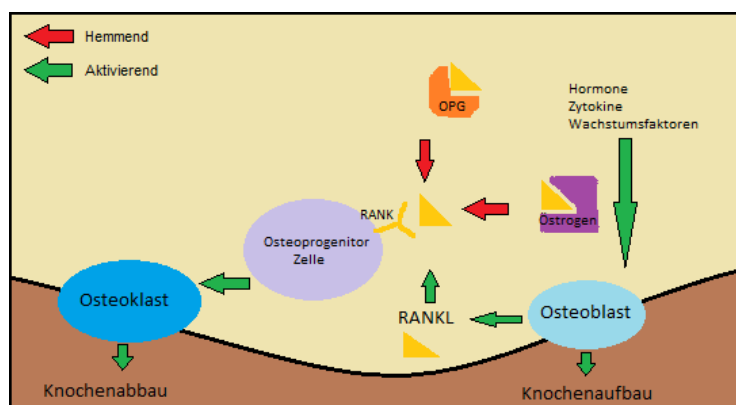


Abbildung 2: Interaktion zwischen Knochenabbau und Knochenaufbau

Die Phase des Remodelling startet, und damit die Interaktion der „basic multicellular unit“ (BMU), indem Makrophagen eine Knochenlücke für die Osteoblasten erstellen. In diese Nische wird von den Makrophagen eine dünne Kollagenschicht sezerniert und

Osteopontin abgegeben, welches die Bindung von Osteoblasten vereinfacht (Villanueva et. al; 1986). Somit tragen Makrophagen eine entscheidende Rolle im Remodelling.

Sind die Osteoblasten am abzubauenen Knochen adaptiert, so kommunizieren diese mit den Osteoklasten über das OPG/RANKL/RANK-System. Von den Osteoblasten wird RANKL ausgeschüttet, welches sich an den entsprechenden Rezeptor (RANK) von Osteoprogenitorzellen setzt und so deren Konvertieren in Osteoklasten fördert. Die Bildung von Osteoklasten kann durch OPG und Östrogene gehemmt werden. So kommt es während des postmenopausalen Östrogenverlustes zu einer überschießenden Bildung von Osteoklasten.

In einer Studie konnte zudem an genveränderten Mäusen gezeigt werden, wie stark die Auswirkungen (Osteoporose bzw. Osteopetrose) durch die Manipulation an diesen Signalstoffen/Rezeptoren ist (Kong et al., 1999).

1.1.4 Osteoporose Tiermodelle

Osteoporotische Tiermodelle wurden vor allem bislang dazu entwickelt in osteoporotischem Knochenstatus die medikamentöse Therapie der Osteoporose zu testen. Diese Modelle sind nur bedingt für Fragestellungen im Bereich der osteoporotischen Frakturheilung zu verwenden.

Um in Zukunft eine bessere Erforschung und Versorgung von osteoporotischen Frakturen gewährleisten zu können, müssen klinische relevante Tiermodelle in diesem Zusammenhang etabliert werden. Dies gilt insbesondere auch für die Fragestellungen mit dem Hintergrund der Stimulation der Frakturheilungsvorgänge bei Osteoporose durch Biomaterialien oder systemische Medikation (Hollinger et al., 2008).

Solche Modelle sollten zum Ziel haben, die Knochenheilungsvorgänge sowie die mechanischen Eigenschaften des Knochens und von Osteosynthesen zu untersuchen. Die generelle Herausforderung hierbei ist die Vergleichbarkeit der Tiermodelle untereinander und zum menschlichen osteoporotischen Knochen. Beim menschlichen Knochen ist eine Osteoporose ab einem T-Wert von 2,5 definiert. Bei Ratten ist die relative Abnahme der Knochendichte nach Ovariectomie geringer als die eines osteoporotischen menschlichen Knochenstatus (Egermann et al., 2010). Auch sind die Effekte der Ovariectomie von Tiermodell zu Tiermodell unterschiedlich. So zeigt sich beispielsweise bei Hunden nach Ovariectomie keine Auswirkung auf die Knochendichte (Martin et al., 1987; Shen et al., 1992) während es bei Primaten zu einem deutlichen Knochendichteverlust kommt (Kasra et al., 1994). Des Weiteren bestehen Probleme in der Vergleichbarkeit der Meßmethoden, da die Knochendichte mit unterschiedlichen Methoden gemessen wird.

So wird Knochendichte mittels DEXA oder alternativ mittels pQCT dokumentiert, welche nicht direkt vergleichbar sind.

Bezüglich der Osteoporose Modelle wird in der Literatur eine ovariectomierte Ratte als Modell für eine postmenopausale Osteoporose akzeptiert (French et al., 2008), so dass in vielen Studien die Ovariectomie als ausreichendes Kriterium für eine manifeste Osteoporose bei der Ratte angenommen wird (Francisco et al., 2011, Ito et al., 2002, Lill et al., 2002).

Essentiell für die qualitative Überprüfung der Osteoporosemodelle ist hier eine Studie, in der gezeigt wurde, dass bei einer im Alter von 14 Wochen ovariectomierten Sprague-Dawley Ratte, welche eine Kalzium und Vitamin D freie Diät bekam, nach 4 Wochen der T-Wert unter -2,5 lag. Im Gegensatz dazu kam es bei einer alleinigen Ovariectomie oder bei Gabe von Steroiden zu keinem signifikanten Abfall des T-Wertes unter -2,5 (Schlewitz et al., 2013). Somit sind zumindest die Grundlagen gelegt, mit diesem Modell Knochenbruchvorgänge und z.B. Knochenersatzmaterialien bei osteoporotischem Knochenstatus zu untersuchen.

In einer weiteren Studie wurde bei ovariectomierten Ratten die Kalzium und Vitamin D freie Diät auf 12 bzw. 14 Monate ausgedehnt. Hier zeigte sich neben einer noch ausgeprägteren Osteoporose mit einem Z-Wert von -5 eine Verringerung des Knochengehaltes (Bone mineral content) in bestimmten Knochenbereichen. Jedoch zeigte sich auch bei den Ratten mit durchgeführter Sham-Operation eine beginnende senile Osteoporose im Alter von 14 Monaten. Insgesamt zeigt die Studie, dass sich das Frakturrisiko bei osteoporotischem Knochen durch die Parameter Knochendichte, Knochengehalt und Knochenbereich bestimmen lässt (Govindarajan et al., 2013). Durch diese Parameter sollten sich in Zukunft Studien an osteoporotischen Tieren vergleichen lassen. Es sollte jedoch in Betracht gezogen werden, dass bezüglich einer senilen Osteoporose die oben beschriebenen Osteoporose Modelle nicht adäquat sind, da der Knochen der Ratte erst mit 10 Monaten ausgereift ist (Jee et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wird die Ratte als Tiermodell verwendet. Diese Tierspezies eignet sich besonders gut für das Vorhaben, da sie neben dem Schaf, die am häufigsten in der Literatur beschriebene Tierspezies in Bezug auf Induktion einer Osteoporose ist (Lill et al., 2002; Egermann et al., 2005; Egermann et al., 2008; Jakob et al., 2007; Tuner 2002).

1.2 Osteoporotische Frakturen

1.2.1 Kennzeichen osteoporotischer Frakturen

Es ist aufgrund der Pathophysiologie der Osteoporose seit langem bekannt, dass osteoporotische Frakturen den metaphysären, trabekulären Knochen betreffen (Peng et al., 1994, Wronski et al., 1985). Am häufigsten sind hierbei der distale Radius sowie der proximale Humerus und Femur betroffen, hingegen sind die diaphysären Regionen der langen Röhrenknochen weniger stark betroffen (Cooper et al., 1992). Die Lokalisation der Frakturen im metaphysären Bereich des Knochens ist ein wichtiges Kennzeichen von osteoporotischen Frakturen, da Unterschiede in der Frakturheilung von Diaphyse und Metaphyse bestehen (Steen et al., 1989), so bildet sich im metaphysären Bereich weniger Kallus als diaphysär (Stuermer et al., 2010).

Ein weiteres Kennzeichen von osteoporotischen Frakturen ist die erhöhte Komplikationsrate während der Frakturheilung (Abbildung 3).

Ein Beispiel hierfür ist die Pseudarthrosenbildung. Hierbei kommt es nicht zu der knöchernen Durchbauung des Frakturspaltes, sondern zur Ausbildung von Narbengewebe an den frakturierten Knochenenden, so dass zwei Oberflächen entstehen, die im Sinne einer Falschgelenkbildung interagieren können.

Der Prozess einer Pseudarthrosenbildung ist aufgrund der großen Varianz im Bezug auf Knochenheilung teilweise schwer einzuschätzen. Zur Diagnose einer Pseudarthrosenbildung spielt neben dem radiologischen Befund die Zeit eine große Rolle. So spricht man von einer Pseudarthrose, wenn es mehr als 3 Monate nach der durchschnittlichen Frakturheilungszeit nicht zu einer radiologisch nachvollziehbaren Durchbauung der Fraktur gekommen ist (Heppenstall, 1980).

In den USA zeigte sich bei 5-10% von über 6 Millionen Frakturen pro Jahr eine verzögerte Frakturheilung bis zu Bildungen von Pseudarthrosen (Einhorn, 1998).

Auch wenn immer wieder neue Methoden in der unfallchirurgischen Versorgung von Frakturen angewendet werden, stellt die Pseudarthrose immer noch eine häufige Komplikation vor allem auch bei osteoporotischen Frakturen dar (Griffin et al., 2009).

Dies verdeutlichen Zahlen der demographischen Entwicklung und dem Ausblick, dass 40% aller Frauen nach der Menopause eine Fraktur mit einem erhöhtem Pseudarthroserisiko davontragen (Reginster et al., 2006).



Abbildung 3: Radiologische Darstellung einer Pseudarthrosenbildung mit Versagen des Osteosynthesematerials bei einer metaphysären Humerusfraktur bei Osteoporose in typischer Lokalisation (Radiologische Abteilung Universitätsklinikum Gießen Marburg, Standort Gießen).

In einigen Studien wurde das Heilungsvermögen von diaphysären Frakturen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass dies in osteoporotischem Knochen aufgrund von zellulären Veränderungen reduziert ist (Tarantino et al., 2011). Das unterschiedliche Heilungsvermögen bei osteoporotischen, diaphysären Frakturen wurde zuvor bereits in mehreren Studien festgestellt (Kubo et al., 1999; Giannoudis et al., 2007; Xu et al., 2003; Namkung-Matthai et al., 2001; Wang et al., 2005).

Aufgrund der typischen metaphysären Lokalisation einer osteoporotischen Fraktur ist es jedoch wichtig, ein osteoporotisches Tiermodell zu verwenden, in dem im metaphysären Bereich eine standardisierte Fraktur etabliert wird. Nur so kann der Vergleich zu den osteoporotischen Frakturen in der metaphysären Region beim Menschen sinnvoll hergestellt werden.

1.2.2 Fraktur-Modelle bei Osteoporose

Wie oben erwähnt, erfordert die Komplexität der Osteoporose bzw. der osteoporotischen Frakturheilung geeignete präklinische Fraktur-Modelle zur klinisch relevanten Untersuchung von osteoporotischen Frakturen sowie zu deren Testung bezüglich von Knochenersatzmaterialien und Medikamenten zur Stimulation der Knochenheilung (Pearce et al., 2007). Ein wichtiger Aspekt ist in diesem Zusammenhang die Lokalisation der Fraktur in der metaphysären Region von Röhrenknochen. In der Vergangenheit für experimentelle Frakturheilungsstudien

wurden basierend auf dem Modell von Bonnarens und Einhorn (1984) geforscht. Hierbei wurden vor allem diaphysäre Frakturen an der Tibia oder am Femur für experimentelle Frakturheilungsstudien am osteoporotischen Knochen am Kleintier verwendet, welche durch eine intramedulläre Schienung oder Fixateur-externe-Anlage osteosynthetisch versorgt wurden (Kubo et al., 1999; McCann et al., 2008; Li et al., 2010; Li et al., 2001a; Li et al., 2001b; Hatano et al., 2004; Hao et al., 2007; Holstein et al., 2007a; Histing et al., 2012) (Tabelle 1). Im Hinblick auf die Tatsache, dass Unterschiede in der Frakturheilung zwischen diaphysärem und metaphysärem Knochen beschrieben sind, wird die experimentelle Untersuchung an der Metaphyse in diesem Zusammenhang noch relevanter (Steen et al., 1989).

Im metaphysären Bereich des Knochens gibt es bislang nur wenige Frakturmodelle am Kleintier. Die meisten Modelle an der Metaphyse beziehen sich lediglich auf Bohrlöcher bzw. Defekte ohne vollständige Kontinuitätsunterbrechung des Knochens, was somit keiner Fraktursituation entspricht (Holstein et al., 2007b; Krischak et al., 2007; Monfoulet et al., 2010; Uusitalo et al., 2001). Das bislang einzige metaphysäre Frakturmodell am Kleintier wurde von Stuermer et al., 2010 vorgestellt. Hier wird über eine Osteotomie an der proximalen Tibiametaphyse eine Kontinuitätsunterbrechung des Knochens erreicht. Die proximale Tibiaregion wird über eine Osteosynthese mit einer T-Platte osteosynthetisch versorgt.

Da bei der Studie am metaphysären Knochen aber erst zum Zeitpunkt der tibialen Osteotomie die Ovariectomie bzw. die Sham-Operation durchgeführt wurde, kann hier kaum von einem durch Osteoporose erkrankten Knochen gesprochen werden.

Somit muss konstatiert werden, dass im Moment keine klinisch relevanten Frakturdefektmodelle am metaphysären langen Röhrenknochen bei osteoporotischen Kleintieren existieren. Die Entwicklung eines solchen Modells stellt das erste Ziel dieser Dissertation dar.

Autoren	Testgruppe	Kontrollgruppe	Anatomische Region	Ergebnisse
Kubo et al. 1999	7 Monate alten weibl. Wistar-Ratten		Femurschaft 3 Monate nach Ovarektomie	12 Wochen post Osteotomie- Abnahme der Knochendichte in der Frakturzone bei der Testgruppe
	OVX verminderte Calcium Diät	SHAM OP		
Meyer et al. 2001	6 Monate alten weibl. Sprague-Dawley Ratten		Interkondyläres Bohrloch	Geringere Knochenfestigkeit und Bruchbelastung bei der Testgruppe.
	OVX	SHAM		
Namkung et al. 2001	2 Monate alten weibl. Sprague-Dawley Ratten		Femurschaft; Intramedulläre Nagelung	Reduktion des Frakturkalluses und der Knochendichte in der Testgruppe.
	OVX verminderte Calcium Diät- Osteoporose Kontrollgruppe	SHAM		
Lill et al. 2003	weibl. schweizer Bergschafe		3mm Tibiaschaft- fraktur; externe Fixation	Kallus mit geringerer Biegesteifigkeit in der Testgruppe.
	Osteoporotisch	SHAM		
Xu et al. 2004	weibl. Wistar Ratten		Femurschaftfrak- tur 3Monate nach Ovarektomie.	Verringerung des Kalluses und der Knochendichte mit Abfall der Osteoblastenzahl im trabekulären Knochen der OVX Tiere
	OVX	SHAM		
Islam et al. 2005	3 Monate alten weibl. Wistar Ratten		Fraktur des Ramus mandibularis 3Monate nach OVX	Verlängerte enchondrale Ossifikation mit einer erhöhten Osteoklastenzahl in der OVX Gruppe
	OVX- Calciumarme Diät	SHAM		
Wang et al. 2005	4 Monate alten weibl. Sprague Dawley Ratten		Tibiaschaft- fraktur 10 Wochen nach OVX	Verlängerte enchondrale Osifikation, Abnahme der Knochendichte und des Kalluses bei OVX.
	OVX	SHAM OP		

Autoren	Testgruppe	Kontrollgruppe	Anatomische Region	Ergebnisse
Qiao et al. 2005	6 Monate alten Sprague Dawley Ratten		Femurschaftfraktur 2 Monate nach OVX	Verringerung der Kallusdichte und der Osteoklastenzahl in der OVX Gruppe.
	OVX	SHAM OP		
Kolios et al. 2010	weibl. Sprague Dawley Ratten im Alter von 12 Wochen Sprague-		Methaphysäre Tibiaosteotomie und standardisierte Plattenfixation 10 Wochen nach Ovariectomie.	Qualitative Steigerung der metaphysären Frakturheilung durch Östrogen ohne sichtbare Auswirkung der Alendronat-Therapie
	OVX 3 Gruppen à 12 (Phytoöstrogen freie Kost, mit Östrogenen, mit Alendronat)	12 SHAM operierte Tiere		
Stuermer et al. 2010	Alter von 3 Monaten bei weibl. Sprague-Dawley Ratten		0.5mm große metaphysäre Osteotomie zum Ovariectomiezeitpunkt	Verbesserte Frakturheilung im osteoporotischen Knochen nach Östrogen und Raloxifen Behandlung
	OVX	SHAM OP		

Tabelle 1: Übersicht der verschiedenen tierexperimentellen, osteoporotischen Frakturmodelle.

1.3 Biomaterialien zur Stimulation der Knochenheilung

1.3.1 Definition von Biomaterialien

In dieser Arbeit wird als Biomaterial ein Knochenersatzmaterial bezeichnet, das in biologische Interaktion mit dem umliegenden Knochengewebe treten soll. Ziel dabei ist, eine Stimulation der Knochenneubildung zu erhalten, die zu einer Integration und einer gleichzeitigen Degradation des Materials führen soll (Kohal et al., 1999).

1.3.2 Mechanismen der Knochenneubildung

1.3.2.1 Osteokonduktion

Unter Osteokonduktion versteht man die Eigenschaft eines Materials, durch seine 3-dimensionale knochenähnliche Architektur als Leitstruktur (Matrix) für die Neubildung

von Knochen zu dienen. Diese dreidimensionale Geometrie wird zum Beispiel von Hydroxylapatit- bzw. Calcium-Phosphat-Keramiken zur Verfügung gestellt, die dadurch für ein Einwachsen des randständigen Lagerknochens und die Knochenneubildung in den Biomaterialien sorgt (Goodman et al., 1998; Schnettler et al., 2003; Schnettler et al., 2005). Auch bei der häufig genutzten autologen Spongiosaplastik spielen osteokonduktive Aspekte bei der Knochenneubildung eine wichtige Rolle (Veitch et al., 2010; Rajan et al., 2006; Chandler et al., 1993).

1.3.2.2 Osteoinduktion

Osteoinduktion beschreibt die *de novo* Bildung von Knochen aus pluripotenten Stammzellen. Hierbei werden über Differenzierungsfaktoren, wie z.B. über die sogenannten Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), mesenchymale Stammzellen zur Differenzierung zu Osteo- und Chondroblasten bzw. deren Vorläuferzellen angeregt und dadurch die Knochenneubildung positiv beeinflusst (Urist, 1965).

1.3.2.3 Osteogenese

Bei der Osteogenese erfolgt die Knochenneubildung direkt über Osteoblasten bzw. deren Vorläuferzellen. Dieses Prinzip lässt sich bei der Behandlung von Knochendefekten oder Defektfrakturen nur über eine autologe Spongiosaplastik verwirklichen, in der vitale knochenbildende Zellen im Knochentransplantat vorhanden sind.

1.3.3 Mechanismen der Degradation von Biomaterialien im Knochen

Als Biodegradation bezeichnet man den Abbau von *in vivo* eingebrachten Ersatzmaterialien (Draenert et al., 2001).

Bei der Biodegradation sollte darauf geachtet werden, dass die Geschwindigkeit des Abbaus von Knochenersatzmaterial der Geschwindigkeit des Knochenaufbaues angepasst ist. Wird das Knochenersatzmaterial zu schnell resorbiert, kommt es zum Verlust der Leitstruktur. Im Gegensatz dazu kann es bei einer zu langsamen Resorption zu einer Behinderung der Durchbauung des Frakturspaltes kommen (Günther et al., 1998).

Da ein Biomaterial stabil und möglichst degradierbar sein sollte und sich die gewünschten Eigenschaften bislang nur bedingt vereinbaren lassen, unterteilt Heinemann zwei Arten von Knochenersatzmaterialien (Heinemann et al., 2011a):

Die erste Gruppe sind Massivimplantate. Diese Materialien sind mechanisch sehr stabil. Es ist allerdings kein Einwachsen von Knochen möglich und die Materialien werden nicht resorbiert.

Die zweite Gruppe sind die Scaffolds. Dieses Knochenersatzmaterial hat einen porösen Aufbau und ermöglicht das Einwachsen von Knochen und Gefäßen. Es soll nach einem bestimmten Zeitraum völlig vom Körper degradiert werden.

Die Basis für das Degradationsverhalten eines Knochenersatzmaterials sind dessen chemische Eigenschaften, wie zum Beispiel der Mineralgehalt eines Materials. Da sich Calciumphosphat wie oben beschrieben als Knochenersatzmaterial eignet, wurde im Rahmen einer Studie die Löslichkeit von Calciumphosphat ($(\text{Ca}(\text{PO}_3)_2)_n$), Beta-Tricalciumphosphat ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_3)_2$) und Alpha-Tricalciumphosphat ($\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_3)_2$) untersucht. Hierbei zeigte sich, dass sich Calciumphosphat ($(\text{Ca}(\text{PO}_3)_2)_n$) nach 24 Stunden im 80°C warmen Wasser am besten löste. Auch bei Alpha- und Beta-Tricalciumphosphat kam es zu einer, jedoch deutlich verlangsamten, Löslichkeit während sich eine noch schlechtere Löslichkeit in Wasser bei Tetracalciumphosphat ($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$) zeigte und sich Hydroxyapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) nur in stark saurem Milieu, welches nur *in vitro* möglich ist, löste (Adam et al., 1998).

Da die Löslichkeit eines Materials mit der Resorption *in vivo* korreliert (Yamada et al., 1997), besteht die Möglichkeit schon *in vitro* eine Vorauswahl an geeigneten Scaffolds zu treffen.

In vivo bestimmt aber nicht ausschließlich die Löslichkeit eines Materials die Geschwindigkeit seiner Degradation, sondern auch die Porosität. Die Porosität (Mikro- und Nanoporosität) eines Materials steht im proportionalen Zusammenhang zu der Resorptionsrate (De Groot 1988). Dies hängt damit zusammen, dass sich hierdurch die Oberfläche des Materials vergrößert und den Osteoklasten *in vitro* eine größere Angriffsfläche zur Verfügung steht.

1.3.4 Silikat-Kollagen-Zweiphasenverbundwerkstoff

Die Herstellung eines Silikat-Kollagen-Zweiphasenverbundwerkstoffes basiert auf der Idee, ein Kompositmaterial zu entwickeln, bei dem die Vorteile der Komponenten synergistisch genutzt werden können (Gelinsky und Heinemann 2010). Hierbei nutzt man Silikat als anorganisches Material als Strukturphase und Kollagen als organisches Material als Matrixphase. Die Strukturphase dient der Gewinnung von Festigkeit, während das organische Material in der Matrixphase für ausreichend Elastizität und Duktilität sorgt (Heinemann et al., 2011b). *In vitro* Ergebnisse zeigen gute Material- und Knochenneubildungseigenschaften dieses Verbundwerkstoffs (Heinemann et al., 2007;

Heinemann et al., 2011b; Heinemann et al., 2011c). *In vivo* Untersuchungen bezüglich der Knochenneubildung und des *in vivo* Verhaltens dieses Biomaterials existieren bislang noch nicht und stellen die zweite Zielsetzung der Arbeit dar.

1.4 Zielstellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll anhand eines neuen metaphysären Frakturdefektsmodells bei osteoporotischen Ratten, die das Einbringen eines Knochenersatzmaterials in den metaphysären Bereich eines Rattenfemurs ermöglicht, deskriptiv der Abbau eines Zweiphasenkonstruktes beschrieben werden.

Im Einzelnen umfasst die Arbeit folgende Ziele:

- Entwicklung eines Tiermodells zur Untersuchung von Biomaterialien bei metaphysären osteoporotischen Frakturdefekten.
- Untersuchung der Interaktionen eines Silikat-Kollagen-Zweiphasenverbundwerkstoff in einem osteoporotischen metaphysären Frakturdefekt mit dem umliegenden Wirtsgewebe.

2 Material und Methode

2.1 Material

2.1.1 Silikat-Kollagen-Zweiphasenverbundwerkstoff

Das Knochenersatzmaterial wurde von der Forschungsgruppe um S. Heinemann, T. Hanke und H. Worch am Institut für Werkstoffwissenschaften des Max-Bergemann-Zentrums für Biomaterialien in Dresden entwickelt und *in vitro* getestet (Heinemann et al., 2009) (Abbildung 4).

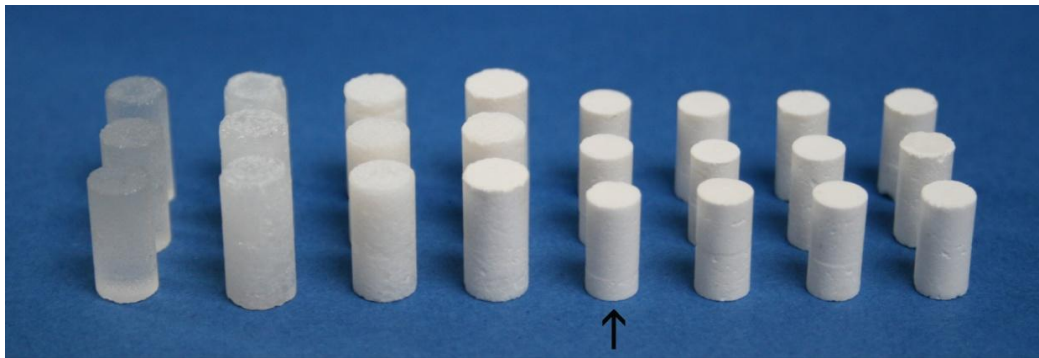


Abbildung 4: Knochenersatzmaterial in verschiedenen Zusammensetzungen aus Kollagen/Silikat/Calcium-Phosphat (von links nach rechts: 100/0/0, 90/10/0, 80/20/0, 70/30/0, 60/40/0, 65/30/5, 50/30/20). Das in dieser Studie verwendete Material ist mit einem Pfeil markiert und stellt ein Zwei-Phasenkonstrukt ohne Calcium-Phosphat-Komponente dar. Zur Verfügung gestellt vom Institut für Werkstoffwissenschaften des Max-Bergemann-Zentrums für Biomaterialien in Dresden.

Das in dieser Studie verwendete Material stellt ein Zwei-Phasenkonstrukt mit einem 70%-igen Kollagen und einem 30%-igen Silikat-Anteil ohne Calcium-Phosphat-Komponente dar.

Zur Herstellung des Materials wurde Tropokollagen Typ I aus dem Rind, eine natürliche Vorstufe des Kollagens, verwendet. Diese Methode wurde bereits in der Vergangenheit zur Herstellung von Kollagen angewendet (Heinemann et al., 2007). Das Tropokollagen wurde in deionisierte Flüssigkeit eingelegt und im Verlauf zentrifugiert. Die daraus entstandenen Kollagenpellets wurden demselben Prozess noch zweimal zugeführt. So konnten Salze und Rückstände entfernt werden. Im Anschluss erfolgte nochmals das Einlegen in deionisiertes Wasser in diesem Fall für 7Tage.

Nach dieser Lipophilisierung wurde das Material bei 4°C gelagert. Am darauffolgenden Tag konnte das Tropokollagen in eine Pufferlösung eingelegt werden, so dass sich

Tropokollagen bei 37°C durch das Ausbilden von Fibrillen zu Kollagen weiterentwickelt (Bierbaum et al., 2003).

Das Silikat wurde aus speziellen Tetraethoxysilanen mittels Wasser und Salzsäure hydrolysiert (Patwardhan et al., 2005). Im Folgenden wurden das Silikat in den in der Abbildung 4 gezeigten Verhältnissen mit dem Kollagen bzw. Calciumphosphat-Kollagen gemischt. In diesem Zustand konnte nach einer Standzeit von 3 Tagen mit dem Gel-Komposit eine Zellkultur angelegt werden. Nach einer weiteren Standzeit von 3 Tagen zur Stabilisierung des Komposites, wurde zur biomechanischen Testung durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe, einer Dehydratation, dem Material weiter Wasser entzogen. Die weitere Trocknung erfolgte in den folgenden 10 Tagen mit im Verlauf absteigender Temperatur und Luftfeuchtigkeit. Vor der biomechanischen Testung wurden gleichmäßige Zylinder von 400mm³ hergestellt (Heinemann et al 2009).

2.1.2 Osteosynthesematerialien

Für eine belastungsstabile Osteosynthese am Rattenfemur wurde eine 8-Loch-Leibinger-Mini-T-Platte (Typ XS, Stryker, Freiburg) verwendet (Abbildung 5). Diese wurde vor Implantation um zwei Loch am langen Schenkel der Platte gekürzt, so dass eine 6-Loch-T-Platte entstand.

Diese 6-Loch-T-Platte wurde mit drei Schrauben (d=2,3mm, l=5mm) im Schaftbereich und mit zwei Schrauben (d=2,3mm, l=8mm) in der Kondylenregion fixiert. Das Plattenloch über der metaphysären Defektregion wurde nicht besetzt (siehe 2.2.2 Op-Technik).



Abbildung 5: 8-Loch Leibinger-Mini-T-Platte nach Kürzung um 2 Loch und Osteosynthese sowie nach 43 postoperativer Explantation des Femurs und der Platte.

2.2 Tierversuch

2.2.1 Studiendesign und Studienablauf

Im Alter von 2,5 Monaten wurde bei 14 Sprague-Dawley Ratten noch beim Züchter (Charles River, Sulzfeld) eine bilaterale Ovariectomie durchgeführt. Im Anschluss wurden die Ratten im Alter von 3 Monaten an das Zentrale Tierlabor geliefert und eingestallt. Nach einer Eingewöhnungsphase von 7 Wochen wurden die Tiere im Alter von 4,5 Monaten am linken Femur operiert. Hierbei wurde im metaphysären Bereich des Femurs eine Osteotomie mit Osteosynthese und Implantation des Knochenersatzmaterials durchgeführt. Bei 5 Tieren wurde ein postoperatives CT durchgeführt, um die Lage der Platte und des Knochenersatzmaterials direkt nach der Operation beurteilen zu können.

43 Tage postoperativ wurden die Tiere durch eine CO₂-Narkose getötet. Im Anschluss wurden beide Femora der Tiere explantiert. Hierbei wurde auf Schwellungen, Wundinfektionen, Implantat, Luxation und Kallus- bzw. Bindegewebsbildungen geachtet.

Nach Explantation der Femora wurden diese der jeweiligen Endpunkt-Untersuchung zur Verfügung gestellt. Hierfür wurden die Tiere in Gruppen aufgeteilt und bezüglich der Biomechanik, Angiologie und Histologie untersucht.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der klinischen Auswertung von 13 Tieren und histologischen Auswertung von 4 Tieren. Die Femora der Tiere für die mikroskopische Auswertung wurden in Paraffin eingelegt und später im Labor zu Präparaten für die histologische Auswertung weiter verarbeitet.

Die 9 Tiere, welche nicht zur histologischen Untersuchung zur Verfügung standen wurden bezüglich der Angiogenese und Biomechanik ausgewertet. So war es möglich, aus einer minimalen Tieranzahl einen maximalen Ergebniserfolg bezüglich der neuen Operationsmethode und des Knochenersatzmaterials zu erreichen.

2.2.1.1 Ethikkommissionsvotum

Der Tierversuchsantrag für dieses Versuchsvorhaben wurde gemäß § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes durch die Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums in Gießen unter der Nummer Gi 20/14-Nr.25/2009 vor Beginn der Studie genehmigt. Die Durchführung des Versuchsvorhabens erfolgte nach der Genehmigung im Zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität in Gießen.

2.2.1.2 Versuchstiere

Die Studie wurde an vierzehn weiblichen, viereinhalb Monate alten Sprague-Dawley-Ratten von Charles River Laboratories, Sulzfeld, durchgeführt. Das Gewicht der Tiere bei der Operation betrug im Durchschnitt $388 \text{ g} \pm 20,9 \text{ g}$.

Die Tiere wurden von der Einstellung bis zur Euthanasie durch einen Tierarzt und dessen pflegerisches Team betreut. Es wurde vor allem die postoperative Wundheilung und die Belastung der operierten Extremität beobachtet. Eine Woche postoperativ wurden die Tiere gewogen und das Gewicht mit dem präoperativen Wert des Gewichts verglichen.

2.2.1.3 Versuchstierhaltung und Fütterung

Die Tiere waren in Makrolonkäfigen Typ III bzw. IV mit erhöhtem Käfigdeckel, welche im klimatisierten Tierstall des Zentralen Tierlabors der Justus-Liebig-Universität-Gießen standen, untergebracht. Die Tiere wurden mit Altrominfutter Typ 1320 gefüttert. Durch eine Trinkflasche am Käfig war die ständige Zufuhr von Wasser gewährleistet. Um die Ratten soweit wie möglich artgerecht zu halten, wurden Höhlen in Form von Papprollen in die Käfige gelegt. Die Tiere wurden nach der Operation für 7-10 Tage einzeln gesetzt, um eine gegenseitige Verletzung zu verhindern. Bevor sie wieder in artgerechte Gruppenhaltung überführt wurden, wurden die Fäden und Klammern entfernt.

2.2.1.4 Narkose

Um eine Adaption an die neuen Umgebungsbedingungen zu gewährleisten wurde bei den Tieren erst nach einer Eingewöhnungsphase von 7 Wochen operativ Knochenersatzmaterial implantiert.

Die Sedierung wurde mit 4 mg/kg KG Xylazin (Rompun® 2 %, Bayer AG, Leverkusen) intraperitoneal eingeleitet. Xylazin ist ein in der Veterinärmedizin verwendetes Medikament mit analgetischen, sedativen und relaxierenden Eigenschaften. Die Narkose wurde durch 100 mg/kg KG Ketamin (Narketan®, Vétoquinol GmbH, Ravensburg) gelöst in 0,9 % NaCl-Lösung (B.Braun, Melsungen) ergänzt. Hierbei blieben die Schutzreflexe vollständig erhalten, so dass die Tiere nicht beatmet werden mussten und es zu keiner Kreislaufdepression kommen konnte. Beide Wirkstoffe wurden in Kombination durch eine einzige intraperitoneale Injektion verabreicht. Vor Operationsbeginn wurde die Narkosetiefe durch einen Schmerzreiz überprüft.

2.2.2 OP-Technik

Vor Operationsbeginn wurde unter Narkose das Operationsgebiet bei allen Ratten rasiert, mit einem Antiseptikum (Braunol[®], B.Braun, Melsungen) desinfiziert mit einem sterilen Lochtuch abgedeckt. Dabei war darauf zu achten, dass die Luftzufuhr zu jedem Zeitpunkt der Operation für die Ratte gewährleistet war, weshalb das Abdecktuch mittels eines Styroporzuschnittes angehoben wurde. Zudem wurden die Augen der Ratte mit Dexpanthenol (Bepanthen[®] Augen- und Nasensalbe, Bayer, Leverkusen) versorgt, um ein Austrocknen der Hornhaut zu verhindern.

Alle Ratten wurden an der distalen Metaphyse ihres linken Femurs osteotomiert.

Um die richtige Lokalisation für die Schnitfführung festzulegen, wurden Femurkopf und die Condylen palpiert (Abbildung 6 a). Die longitudinale Hautinzision lag ventrolateral und betrug 3 cm. Um die Weichteile möglichst zu schonen, wurde entlang des Septums zwischen Musculus vastus medialis und Musculus vastus lateralis präpariert. Nach einer ausreichend guten Darstellung des distalen Femurs, wurde die Patella nach medial luxiert, damit die Platte optimal fixiert werden konnte.

Die Leibinger-Mini-T-Platte, normalerweise in der Handchirurgie verwendet, wurde mit fünf Schrauben am Femur fixiert. Drei Schrauben mit einer Länge von 5 mm wurden im Schaft platziert und zwei Schrauben mit einer Länge von 8 mm in den Femurcondylen (Abbildung 6 b und 6 c). Bei den condylären Schrauben, die zuerst gesetzt wurden, war darauf zu achten, dass es zu keiner intraartikulären Schraubenlage kam. Bei dem durch die Platte in achsengerechter Position fixierten Femur wurde mit einer oszillierenden Säge, unter ständiger Kühlung mit Ringerlösung (B.Braun, Melsungen), eine leicht keilförmige Osteotomie mit einem Volumen von ca. 400 mm³ durchgeführt. Hierbei wurde die Kortikalis des Femurs komplett durchtrennt, um eine authentische Fraktursituation zu simulieren (Abbildung 6 d). In die Osteotomielücke sollte das zylinderförmige Knochenersatzmaterial „pressfit“ implantiert werden (Abbildung 6 e). Im OP Protokoll wurde erfasst, ob das Biomaterial mit oder ohne Zuschnitt bzw. in pressfit-Technik implantiert werden konnte. Die Wunde wurde durch eine Fasziennaht mit 3/0 Vicryl- und einer Hautnaht mit 4/0 Prolene-Faden (Ethicon[®], Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt) schichtweise verschlossen.

Da die Ratte als Nagetier den Faden nicht lange toleriert, wurden zur Sicherstellung einer optimalen Wundheilung zusätzlich Michaelisklammern (Henry Schein[®], Hamburg) verwendet (Abbildung 6 f). Diese wurden nach Abheilen der Wunde, falls noch vorhanden, entfernt.

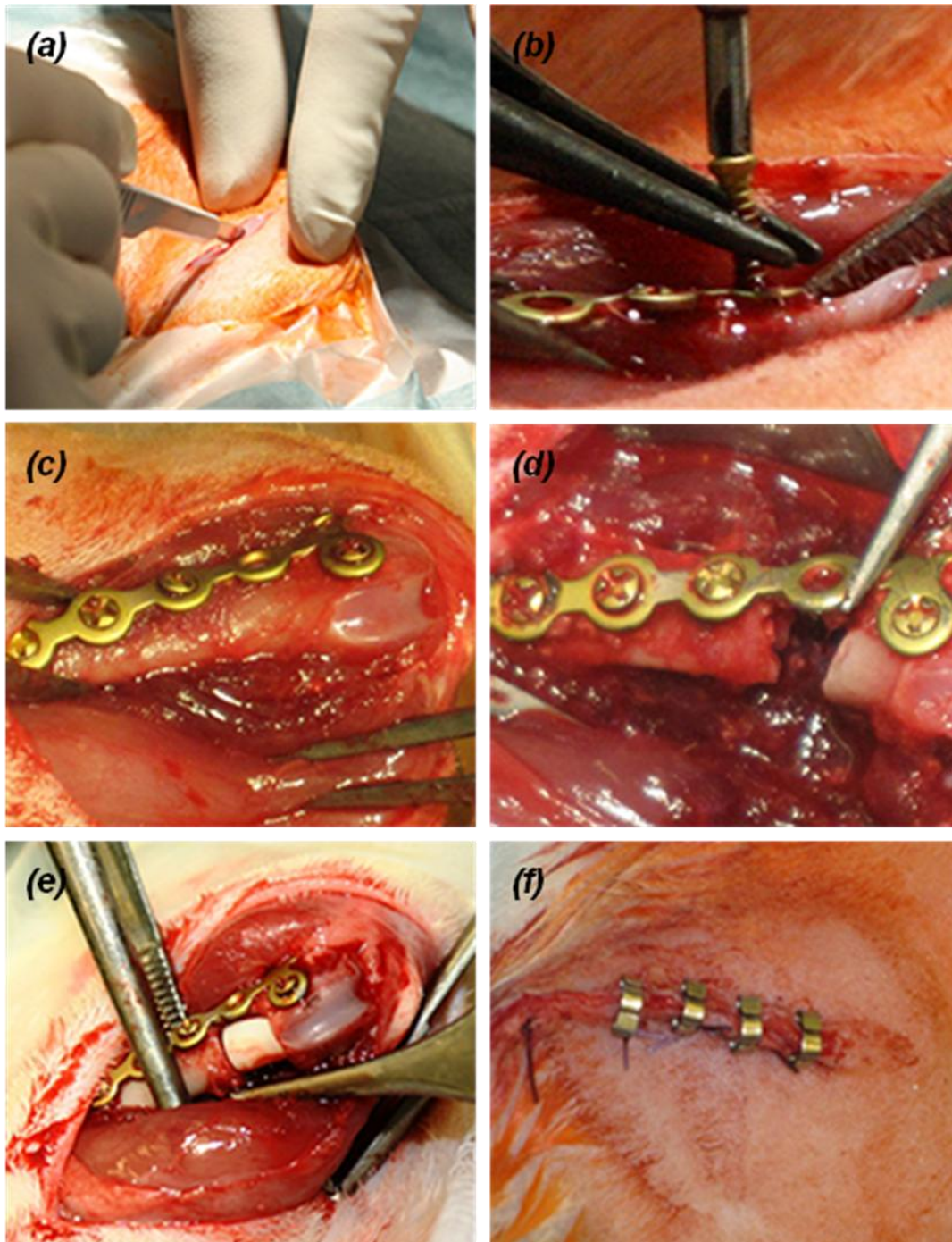


Abbildung 6: (a) Hautschnitt; (b) Einbringen der Platte; (c) optimale Lage der Platte möglichst condylennah; (d) Osteotomie-Defekt; (e) Defekt versorgt mit pressfit sitzendem Knochenersatzmaterial; (f) Naht und Klammern;

2.2.3 Postoperative Beobachtung

In den 43 Tagen zwischen Operation und Euthanasie wurden die Tiere durch einen Tierarzt und dessen Tierpfleger betreut.

Nach der Operation wurden die Tiere in Einzelkäfigen unter einer Infrarot-Wärmelampe untergebracht, bis sie wieder bei vollem Bewusstsein waren. Danach wurden sie 7 bis 10 Tage einzeln gehalten, um gegenseitige Verletzungen zu verhindern. Bei den täglichen Kontrollen der Tiere wurde insbesondere auf das Gewicht, Rötung und Schwellung der Wunde, Schonhaltung der osteotomierten Extremität und verminderte Futteraufnahme geachtet. Zur adäquaten postoperativen Schmerztherapie vom Tag der Operation bis zum 5. Tag postoperativ wurden die Tiere mit Meloxicam[®] (Metacam[®], Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein) s. c. 0,2 mg/kg KG / Tag behandelt.

Nach zehn Tagen konnten die noch vorhandenen Michaelisklammern und Fäden entfernt werden, soweit diese die Ratten nicht schon selbst entfernt hatten. Anschließend konnten die Tiere wieder in einer Gruppe gehalten werden.

2.2.4 Postoperative Computer-Tomographie

Das postoperative CT wurde bei 6 Tieren mit dem Somatom Definition[®] von Siemens durchgeführt. Dieses Gerät arbeitet mit dem Dual Source Verfahren. Dabei werden gleichzeitig mit zwei Röntgenquellen und zwei Detektoren Aufnahmen gemacht. Bei den Aufnahmen wurde mit 80 kV, MAS 19 und SL 0,6 gearbeitet.

Die Bilder entstanden in der Abteilung für Diagnostische Radiologie im Uniklinikum Marburg und Gießen, Standort Gießen.

2.2.5 Euthanasie der Tiere

Die Tiere wurden 43 Tage postoperativ schmerzlos nach Narkoseinduktion (siehe oben) mit CO₂ getötet.

2.2.6 Makroskopische Auswertung

Zur makroskopischen Auswertung wurden von den getöteten 13 Tieren beide Femora und Tibiae explantiert. Vor der Explantation wurde eine Beurteilung der Wundheilung vorgenommen. Abweichungen wie Schwellungen mit oder ohne Entzündungszeichen wurden entsprechend dokumentiert. Danach wurde der Muskelmantel um Femur und Tibia entfernt, um die operierte distale Femurregion mit dem einliegenden Knochenersatzmaterial und der Plattenosteosynthese zu begutachten. Auffälligkeiten, wie Plattenbrüche oder Dislokationen des Implantats, wurden mittels Photographie festgehalten.

2.2.7 Histologische Auswertung

Die histologische Untersuchung erfolgte mit einem Lichtmikroskop vom Typ Axioplan. Die Fotos wurden mit Hilfe eines Fotomoduls (Universal Mikroskop Axioplan und Axiophot 2, Carl Zeiss Jena GmbH, Deutschland) angefertigt. Untersucht wurden Paraffin-Schnitte (5-6 μm) und Dünnschliffe (20-30 μm) aus Technovit 7200 (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) in den Färbungen Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Toluidinblau.

Bei den enzymhistochemischen Untersuchungen wurden Dünnschliffe aus Technovit 9100 (Heraeus Kulzer GmbH) verwendet.

2.2.7.1 Trenn-Dünnschliff-Technik

Mit dieser Technik kann nach der etablierten Methode von Donath und Breuner (1982) mit Hilfe eines Lichtmikroskops kalkhaltiges und nicht schneidbares Knochengewebe analysiert werden. Hierbei wurden das EXAKT-Trennschleifsystem 310 CL, EXAKT-Mikroschleifsystem 400 CS und das EXAKT-Steuerungssystem (EXAKT-Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) verwendet, um eine bestmögliche Oberflächengüte und Planparallelität zu erhalten.

Das hierfür verwendete Protokoll lautet wie folgt:

1. Fixation
2. Entwässerung
3. Infiltration
4. Planparallele Einbettung
5. Polymerisation
6. Aufblockung

2.2.7.2 Paraffin-Technik

Nachdem die Präparate fixiert worden waren, wurden sie in EDTA-Lösung (x M in Y M Tris/HCL ph 7,4) bei Zimmertemperatur auf einem Schüttler (Heidolph Vibrax 100, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) entkalkt. In Abhängigkeit von der Größe und der Dicke der Knochenpräparate benötigte die Entkalkung drei bis fünf Wochen. In diesem Zeitraum wurde alle 2 Tage die EDTA Lösung erneuert. Sobald die Knochenpräparate entkalkt waren, wurden sie durch einen Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomaten TP1050 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) entwässert und in Paraffin eingebettet.

Mittels eines Rotationsmikrotoms (LEICA RM 2155, LEICA Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) konnten nun aus einer eingebetteten Probe zehn Schnitte à 3-5 μm Dicke produziert werden.

2.2.7.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Zunächst mussten die Knochenschliffe angeätzt werden, wofür sie für 30 Minuten mit 20 % H_2O_2 in Kontakt gebracht wurden. Anschließend wurden sie mit Aqua dest. gespült. Nun wurden sie über sechs Minuten mit Mayers Hämalaunlösung gefärbt. Dies ließ später die Kerne der Zellen blau erscheinen. Nach einem weiteren Waschschriff mit Aqua dest. wurde eine Minute mit Eosinlösung gefärbt. Diese ließ das Zytoplasma der Zellen später rot erscheinen. Im Anschluss an einen weiteren Waschschriff mit Aqua dest. wurden die Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %) entwässert und zweimal für fünf Minuten in jeweils frischem Xylol eingelegt, um sie dann mittels Eukitt (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) einzudecken.

Bei Paraffin-Schnitten war zu beachten, dass sie vor dem Färbeprozedere erst zweimal für fünf Minuten in jeweils frischem Xylol entparaffiniert und mit einer absteigenden Ethanol-Reihe (100 %, 96 %, 70 % je 3 Minuten) dehydriert werden mussten.

Zum Schluss wurden die gefärbten Schnitte eingedeckt. Hierfür wurde das Eindeckmedium DePex verwendet (VWR International Ltd Lutterworth, England).

2.2.7.4 Toluidinblau-Färbung (Tb)

Verwendet wurde eine Toluidinblau-O-Pyronin-G-Lösung im Verhältnis 8:2 aus zwei verschiedenen Stammlösungen (A und B). Die Stammlösung A bestand aus Dinatriumtetraborat (Merck, Darmstadt, Deutschland) und Toluidin-O (Chroma, Köngen, Deutschland) jeweils 1 % in Aqua dest.. Die Stammlösung B bestand aus Pyronin G 1 % in Aqua dest (Merck, Darmstadt, Deutschland). Beide Lösungen wurden durch 15 Minuten Schütteln gemischt.

Wie auch schon bei der Hämatoxylin-Eosin Färbung wurden die Knochenschliffe vor dem eigentlichen Färbvorgang erst mit 20 % H_2O_2 -Lösung für 30 Minuten angeätzt. Nun konnte die zuvor filtrierte Toluidin-O-Lösung auf die Schliffe getropft und für 10 Minuten inkubiert werden. Nach einmaligem Waschen mit Aqua dest. wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %) entwässert und in jeweils frischem Xylol zweimal 10 Minuten eingelegt. Die abschließende Eindeckung erfolge mit Eukitt (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland).

Bei den Paraffin-Schnitten war wie bei der Hämatoxylin-Eosin Färbung zu beachten, dass sie vor der Färbeprozedur entparaffiniert und dehydriert werden mussten.

2.2.7.5 Immunhistochemische Untersuchungen

2.2.7.5.1 Nachweis von tartratresistenter saurer Phosphatase (TRAP)

Um die tartratresistente saure Phosphatase auf Technovit 9100 Schliffen nachzuweisen, wurde zunächst durch Inkubation von zweimal 20 Minuten in 2-Methoxyethylacetat (MEA, Merck, Darmstadt, Deutschland) der Kunststoff entfernt. Der eigentliche enzymhistochemische Nachweis der TRAP wurde mit dem TRAP-Kit® (Acid Phosphatase, Leukocyte TRAP-Kit®, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Die im Kit enthaltene Gegenfärbung mit der Säure Hämalaun wurde nicht durchgeführt, um die positive TRAP Färbung besser zu erkennen.

Nachdem der Kunststoff entfernt worden war, wurden die Schliffe zuerst mit Aceton für 10 Minuten und mit einer Aceton-Waschpuffer-Lösung (Verhältnis 1:1) gespült. Nach diesem Schritt wurden die Schliffe dann zweimal 3 Minuten nur mit Waschpuffer gespült. Darauf folgte eine Inkubation von 40 Minuten bei 37°C in Naphthol-AS-BI-Phosphorsäure und Fast Garnet GBC-Salz. Durch diese beiden Substanzen entstand bei einem positiven Ergebnis später eine kastanienbraune Ablagerung, da die TRAP Naphthol-AS-BI-Phosphorsäure spaltet. Daraufhin kann sich Naphthol-AS-BI mit Fast Garnet GBC-Salz verbinden, und der Farbstoff entsteht. Um sicher zu stellen, dass nur die knochenspezifische TRAP nachgewiesen wurde, wurden die anderen Isotypen des Enzyms mit einem L(+)-Tartrat haltigen Substrat blockiert. Zum Schluss wurden die Schliffe eingedeckt. Hierfür wurde Kaisers Glycerin-Gelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

2.2.7.5.2 Nachweis von ED1-positiven Zellen (ED1)

Als erstes wurden die Paraffinschnitte durch zweimal 5 Minuten Einlegen in jeweils frischem Xylol entparaffiniert. Danach wurden sie 10 Minuten lang mit Aceton gespült, um sie dann wiederum 10 Minuten in eine Aceton-Waschpuffer-Lösung im Verhältnis von 1:1 einzulegen. Nun wurden die Schnitte dreimal mit dem Waschpuffer gespült.

Bei den entparaffinierten Schnitten wurde zunächst die endogene Peroxidase durch Einlegen in 3 % H₂O₂ für 5 Minuten und zweimaliger Spülung mit dem Waschpuffer blockiert. Danach wurden sie mit in Antibody Diluent® (Dako Noerth America Inc., Carpinteria, USA) verdünntem Primärantikörper für 16 Stunden bei 8°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Anschließend erfolgte nach einer Spülung mit Waschpuffer eine weitere Inkubation in einer feuchten Kammer für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit einem Peroxidase

konjugierten Avidin-Biotin-Komplex (ABComplex/HRP, K0355, DAKO, Dänemark), der mit 0,05 M Tris-Na-Cl-Puffer verdünnt war.

Nach dieser Inkubation folgten wiederum zwei Spülungen mit Waschpuffer.

Anschließend wurden die Präparate 5 Minuten in Aqua dest. gewaschen, damit sie im Anschluss mit Hämatoxylin gegengefärbt werden konnten. Die überflüssige Farbe wurde unter fließendem Leitungswasser ausgewaschen und dann mit einer ansteigenden Alkoholreihe (70 %, 90 %, 100 %, Isopropanol, Xylol) entwässert. Zum Schluss wurden die Präparate eingedeckt.

3 Ergebnisse

3.1 Intra- und postoperativer Verlauf

Bei den ersten drei Tieren zeigte sich zunächst eine OP Zeit von 52 Minuten, welche sich im Verlauf bis auf durchschnittlich 25 Minuten bei den letzten drei Tieren verkürzte. Als technisch besonders anspruchsvoll stellte sich die Osteotomie des Rattenfemurs mit einer oszillierenden Säge dar. Neben der Schonung von Blutgefäßen, Nerven oder der Muskulatur, musste auf die exakte Geometrie des Biomaterials geachtet werden, um dieses exakt pressfit einzusetzen.

Dies gelang nicht bei allen Tieren, so dass das Knochenersatzmaterial in den Defekt nicht immer pressfit eingesetzt werden konnte. Bei den ersten sechs Operationen wurde das Knochenersatzmaterial zugeschnitten, um es passend in den Frakturspalt ein zu setzen. In den anschließenden Operationen konnte der Frakturspalt so groß gewählt werden, dass das Material pressfit eingebracht werden konnte. Bei Tier 12 wurde der Frakturspalt jedoch zu groß gesetzt, so dass das Material locker im Spalt zum liegen kam.

Die Tiere zeigten intraoperativ keine Schmerzsymptomatik und schliefen die gesamte Operationszeit bis zu einer Stunde ruhig. Nur bei Tier 2 kam es bei der Narkoseeinleitung zu Komplikationen im Sinne eines Atemstillstands. Trotz der Gabe von antagonistisierenden Medikamenten und Herzdruckmassage ließ sich das Tier nicht erfolgreich reanimieren, so dass es noch vor Beginn der Operation verstarb.

Bei keinem der dreizehn Tiere kam es zu einer postoperativen klinischen Komplikation. Postoperativ kam es bei allen Tieren in der ersten Woche zu einem leichten Gewichtsverlust (Abbildung 7), welcher jedoch in den folgenden 4 Wochen mehr als kompensiert wurde. Auch zeigte sich, dass es von Vorteil gewesen war, die Naht neben einem Faden mit Michelisklammern zu schützen. Zum Zeitpunkt des Fadenzuges, 10 Tage postoperativ, fanden sich nur noch vereinzelte Michelisklammern über der Naht, da die Tiere diese selbständig entfernt hatten.

Die Tiere hatten zum Zeitpunkt der Femurexplantation im Vergleich zum präoperativen Gewicht durchschnittlich um 8% an Körpergewicht zugenommen.

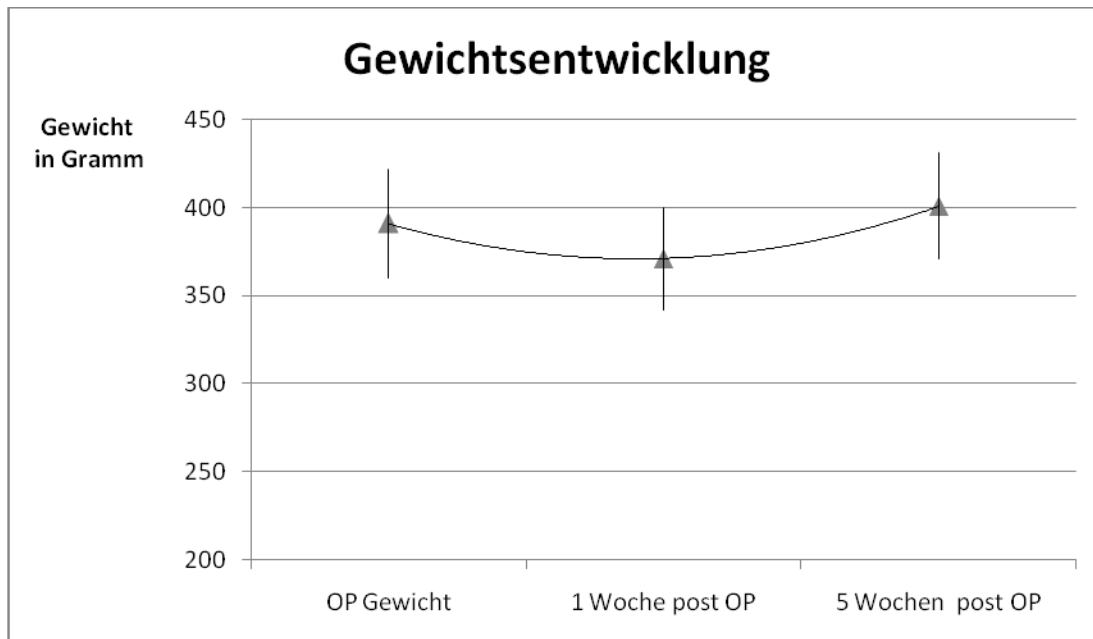


Abbildung 7: Darstellung der Gewichtsentwicklung postoperativ.

Die Wunde des linken Femurs verheilte bei allen Tieren reizlos und ohne Auffälligkeiten. Es zeigte sich bei allen Tieren ein unauffälliges Gangbild mit voller Belastung des operierten Beines. Bei Tier 7 und 10 fiel am Tag der Femurexplantation eine Schwellung am linken Knie ohne Einschränkung im Bewegungsausmaß auf.

Die Narkotisierung am 43. postoperativen Tag mit anschließendem Exitus letalis verlief komplikationslos, so dass im Anschluss die Femora beidseits explantiert werden konnten bzw. die Tiere ihren Endpunktuntersuchungsgruppen zugeteilt werden konnten (Tabelle 2).

Ziel der verschiedenen Endpunktstudien war es, das neue Operationsverfahren einer metaphysären Osteotomie am ovariectomierten Tiermodell, sowie das implantierte Knochenersatzmaterial in einem möglichst breiten Spektrum zu untersuchen.

Ohrmarke	Untersuchungen				Endpunkte-Untersuchung		
	Röntgen	CT	MRT	DEXA	Biomechanik	Micro-CT	Histologie
1				x	x		
2	Exitus letalis bei Narkose zur Implantation des Knochenersatzmaterials						
3							x
4	x	x		x	x		
5	x	x		x	x		
6		x		x	x		
7		x		x	x		
8		x	x				x
9		x	x				x
10			x				x
11			x			x	
12			x			x	
13			x			x	
14			x			x	

Tabelle 2: Übersichtstabelle der verschiedenen Untersuchungen in der Auswertungsgruppe

3.2 Makroskopische Ergebnisse der Femurexplantation

Bei Ratte 1 und 3 (Abbildung 8), sowie 11 bis 14 zeigte sich um das eingesetzte Knochenersatzmaterial ein bindegewebsartiger Schlauch. Es war weder eine Entzündungs- noch eine Abstoßungsreaktion um die Osteotomie und das Knochenersatzmaterial zu erkennen. Die Platte und die einliegenden Schrauben lagen regelrecht und zeigten keine Lockerungen.



Abbildung 8: Explantiertes Femur der Ratte 3. Biomaterial bindegewebig umbaut, ohne Osteosyntheseplatte stabil

Aus dieser Gruppe heraus wurde das explantierte Femur von Ratte 3 weiter histologisch untersucht. Die anderen Tiere wurden der biomechanischen und der micro-CT Untersuchung zugeführt.

Bei Ratte 4 zeigt sich neben einer stabilen Osteosynthese eine dunkel, nekrotisch wirkende Verfärbung des bindegewebigen Schlauches entlang des implantierten Knochenersatzmaterials. Das Tier selbst war zuvor in der klinischen Beobachtung unauffällig gewesen und nahm gut an Gewicht zu. Ratte 4 wurde plangemäß in der Biomechanik weiter untersucht, so dass eine Bestimmung der Nekrosetiefe in der histologischen Untersuchung zustande kam. Die Platte wurde vorerst belassen.

Bei Ratte 5 zeigte sich das explantierte Femur mit einer stabilen Osteosynthese. Jedoch war das Knochenersatzmaterial hier nicht durch einen bindegewebigen Schlauch umbaut, sondern lag frei. So konnte man erkennen, dass es in viele kleine Teile zerfallen war und lose unter der stabilen Osteosynthese im Frakturspalt zum Liegen kam. Da die Ratte in ihren Bewegungsabläufen nicht auffällig wurde, bestätigt dies die Stabilität der Osteosynthese.

Bei Ratte 6 zeigte sich wiederum eine durch Bindegewebe umgebene Defektstelle mit einliegendem Knochenersatzmaterial. Auch die Osteosynthese zeigte sich stabil. In der makroskopischen Begutachtung des explantierten Femurs fiel jedoch ein deutlicher Rotationsfehler auf. Das operierte Femur konnte durch die Osteosynthese nicht achsgerecht stabilisiert werden.

Bei Ratte 7 zeigte sich eine weichteilige Raumforderung über dem Kniegelenk. Diese zeigte in der klinischen Untersuchung eine Bewegungseinschränkung im Sinne einer eingeschränkten Extension. Die Ratte hatte jedoch gut an Gewicht zugenommen und war im Rahmen der klinischen Beobachtungen nicht weiter auffällig gewesen.

Bei Ratte 8 (Abbildung 9) bildete sich genau wie bei Ratte 1 ein bindegewebsartiger Schlauch um die Osteotomie und das Knochenersatzmaterial. Zusätzlich breitete sich das Bindegewebe über die Platte aus, so dass es beim Entfernen der Platte mutmaßlich auch zur Zerstörung der bindegewebsartigen Stabilisation gekommen wäre. Aus diesem Grund wurde hier die Platte zunächst belassen und erst zur Herstellung der Schnitte für die histologischen Untersuchungen entfernt. Die durch Bindegewebe umbaute Platte findet sich auf Höhe des implantierten Knochenersatzmaterials. Das nahe liegende Gelenk wurde hierdurch in seinem Bewegungsumfang nicht beeinträchtigt. Interessant war bei diesem makroskopischen Ergebnis die histologische Auswertung der bindegewebsartigen Hyperplasie bezüglich der Integration des Knochenersatzmaterials in das Bindegewebe.



Abbildung 9: Explantiertes linkes Femur der Ratte 8; Bindegewebige Überwucherung der Osteosyntheseplatte in stabiler Situation.

Bei Ratte 9 (Abbildung 10) kam es ähnlich wie bei Ratte 3 zu einer bindegewebsartigen Einfassung des Osteotomiegebietes, jedoch nicht zur Überwucherung der Platte. Dieser Befund erlaubte auch hier die Explantation der Platte, ohne dass anschließend die Stabilität des explantierten Femurs gestört war. Jedoch lag das Knochenersatzmaterial nicht so fest im Osteotomiespalt wie bei Tier 3. Auch erscheint die bindegewebsartige Einfassung nicht so stabil wie bei Tier 3.



Abbildung 10: Explantiertes Femur links von Ratte 9 mit stabiler Osteosynthese und mit Bindegewebe umgebener Defekt mit korrekt in situ liegendem Biomaterial

Bei Ratte 10 (Abbildung 11) zeigte sich nach der Femurexplantation im Vergleich zu den vorherigen Tieren ein etwas anderes Bild. Hier kam es nicht zu einer ausgeprägten Bindegewebsbildung wie bei den anderen drei Tieren. Bei diesem Tier war das Gebiet der Osteotomie noch deutlich zu erkennen, was eine makroskopische Beurteilung des seit 43 Tagen implantierten Knochenersatzmaterials ermöglichte.



Abbildung 11: Explantiertes Femur links von Tier 10 mit Defektbildung durch fehlende Integration des Knochenersatzmaterials und geringer Bindegewebsneubildung.

Bei Ratte 12 zeigte sich am Tag der Femurexplantation eine instabile Femurachse durch ein Versagen der Osteosynthese mit gebrochener Platte. Des Weiteren lag eine der condylennahen Schrauben intraartikulär und die Lage der Platte erschien etwas zu weit distal. Im Defekt selbst lag das Knochenersatzmaterial von Bindegewebe umgeben, jedoch war ein Spalt zwischen Knochenersatzmaterial und Knochen zu palpieren.

Es zeigte sich bei den Tieren, dass das Knochenersatzmaterial aufgrund seiner vorgegebenen Form und Größe nicht ideal im osteotomierten Defekt eingepasst werden konnte. Problematisch war es vor allem im Interfacebereich, in dem bei diesem explantierten Femur das Knochenersatzmaterial nur mit einem geringen Anteil des Knochens in Kontakt treten konnte. Außerdem befand sich das Knochenersatzmaterial nicht fest im Spalt und wies somit keine ausreichende Stabilität im Osteotomiespalt auf. Dies hatte zur Konsequenz, dass sich das Knochenersatzmaterial nicht zu einer stabilen Einheit mit dem Knochen verbinden konnte.

	Intraoperativ	5 Wochen postoperativ	6 Wochen postoperativ (nach Euthanasie)		
Tier	KEM bei Implantation	Gewichtsentwicklung	Wundheilung	Osteosynthese	Knochenersatzmaterial
1	Zugeschnittenes KEM, pressfit	+3%	reizfrei	stabil	Integration durch umliegendes Bindegewebe
2	Exitus letalis während der Narkoseeinleitung				
3	Zugeschnittenes KEM, pressfit	-1%	reizfrei	stabil	Integration durch umliegendes Bindegewebe
4	Zugeschnittenes KEM pressfit	+2%	reizfrei	stabil	Integration durch umliegendes Bindegewebe mit nekrotischer Verfärbung
5	Zugeschnittenes KEM pressfit	+3%	reizfrei	stabil	luxiert im Weichteilgewebe
6	Zugeschnittenes KEM, pressfit	+2%	reizfrei	instabil und rotierte Fehlstellung	Integration durch umliegendes Bindegewebe
7	Zugeschnittenes KEM, pressfit	+6%	Entzündungsfreie Knie-Schwellung Beuge-Kontraktur	stabil	Integration durch umliegendes Bindegewebe
8	Kein Zuschnitt pressfit	+5%	reizfrei	stabil	luxiert im Weichteilgewebe
9	Kein Zuschnitt, pressfit,	+5%	reizfrei	stabil, Schraube intraartikulär	luxiert im Weichteilgewebe
10	Kein Zuschnitt, pressfit,	+7%	Entzündungsfreie Knie-Schwellung	stabil	Integration durch umliegendes Bindegewebe
11	Kein Zuschnitt, pressfit	0%	reizfrei	stabil,	Integration durch umliegendes Bindegewebe
12	Kein Zuschnitt Nicht pressfit	+2%	reizfrei	Platte gebrochen, Schraube intraartikulär	regelrechte Lage des KEM, Spalt in Defekt tastbar
13	Kein Zuschnitt, pressfit	+0%	reizfrei	stabil,	Integration durch umliegendes Bindegewebe
14	Kein Zuschnitt, pressfit	+8%	reizfrei	stabil,	Integration durch umliegendes Bindegewebe
Insg.	Kein Zuschnitt 7/13 pressfit 12/13	+3%	reizfrei 11/13	stabil 11/13	Integriert 9/13

Tabelle 3: Übersicht über makroskopische intraoperative und postoperative makroskopische Ergebnisse und der Gewichtsentwicklung in % zum präoperativen Gewicht

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass dieses Tiermodell die Schaffung eines metaphysären Frakturdefekts an der distalen Femurmetaphyse erlaubt. Es wurde nur ein Tier während der Narkose zur Femuroperation verloren. Alle operierten Tiere überstanden die postoperative Beobachtungszeit problemlos mit einem leichten Zugewinn an Körpergewicht. Die Haut- und Wundheilung war bei den postoperativen

Kontrollen bei 11 von 13 Tieren stets unauffällig, nur bei 2 Tieren kam es zu einem postoperativ prolongierten Schwellungszustand. Die Osteosynthese führte bei 11 der 13 Tiere auch 43 Tage postoperativ zu einer stabilen und Situation und somit kann die Osteosynthese über eine T-förmige Plattenosteosynthese in diesem Modell als belastungsstabile Technik bezeichnet werden. Das Zweiphasenkonstrukt zeigte deutliche Reaktionen mit dem umliegenden Gewebe und wurde in 9 von 13 Fällen zumindest bindegewebig integriert.

3.3 Radiologische Ergebnisse

Bei Tier 4 bis 9 wurde direkt postoperativ ein CT durchgeführt, um die exakte Position der Osteotomie, die Lage des Knochenersatzmaterials und die Osteosynthese zu beurteilen.

Es zeigte sich, dass bei den Tieren die Osteotomie des linken Femurs in der metaphysären distalen Femurregion gesetzt wurde und die beabsichtigte Größe von ca. 400 mm³ aufwies (Abbildung 12 a).

Auch die Plattenosteosynthese zeigte sich in ihrer Position korrekt. Bei der Beurteilung der Lage der Condylenschrauben lag bei 5 Tieren kein Hinweis auf eine intraartikuläre Lage vor. Lediglich bei einem Tier konnte eine intraartikuläre Schraubenlage nicht sicher ausgeschlossen werden. Des Weiteren wiesen alle Schrauben eine korrekte Länge auf, ohne die schraubenkopferne Kortikalis bei den Schaftschrauben bzw. Condylenschrauben allzu weit zu überschreiten.

Das Knochenersatzmaterial wurde dicht an den Condylen (Abbildung 13 b) und damit sicher im metaphysären Bereich des Femurs platziert. Des Weiteren ließ sich auf den CT-Bildern gut erkennen, dass das Knochenersatzmaterial pressfit im Osteotomiedefekt zum Liegen kam und auch nach Verschluss der Wunde und Transport des Tieres ins CT nicht dislozierte. Es konnte jedoch auch beobachtet werden, dass gerade bei Tier 9 die randbildende Seite des Knochenmaterials nicht auf gleicher Höhe mit dem Femur abschließt sondern eine Kante bildet. (Abbildung 12 a). Neben einer korrekten metaphysären Osteotomie und einer stabilen Osteosynthese waren im CT Lufteinschlüsse zu sehen (Abbildung 12 b). Diese Lufteinschlüsse waren dadurch zu erklären, dass die Operation nur wenige Stunden zurück lag und die bei der Wundnaht verschlossene Luft noch nicht vom Körper resorbiert werden konnte.

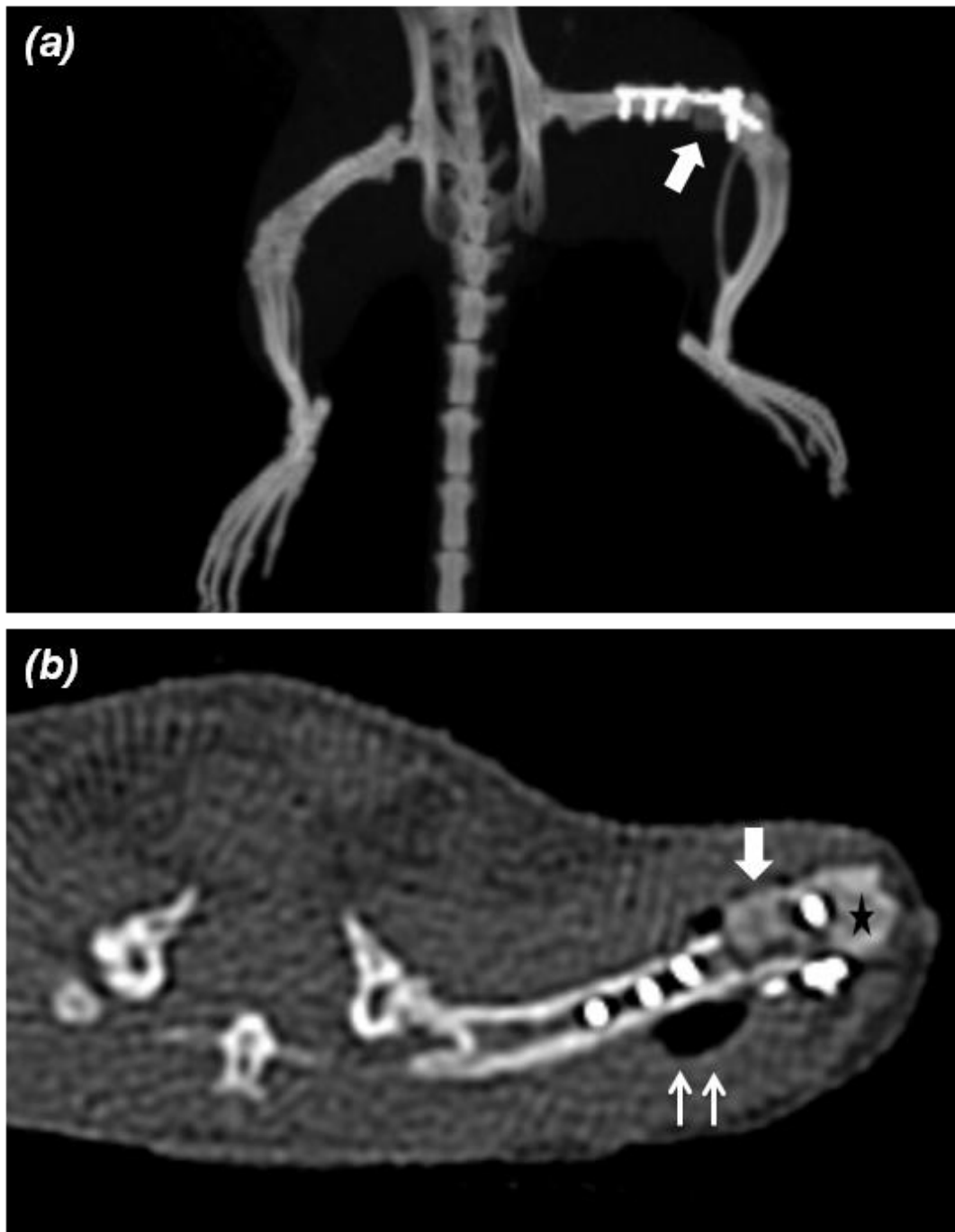


Abbildung 12: (a) Postoperatives CT bei Ratte 9 zeigte die korrekte Lage der Platte, Schrauben und des Knochenersatzmaterial (weißer Pfeil); (b) Postoperatives CT bei Ratte 9 in axialer Schnittebene zeigte Lufteinschlüsse (weiße Doppelpfeile) und die direkte Nähe des Knochenersatzmaterial (weißer Pfeil) zu den Condylen (schwarzer Stern). (Abteilung für Diagnostische Radiologie Universitätsklinikum Gießen-Marburg, Standort Gießen).

3.4 Histologische Ergebnisse

Die Schnitte aus den operierten Femora wurden in verschiedenen Färbungen untersucht. Hierbei wurden Standardfärbungen mit Hämatoxylin-Eosin und Toluidinblau verwendet. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Grenzflächenregion zwischen Knochenersatzmaterial und umgebenden Lagerknochen gelegt, um Reaktionen zwischen dem Wirtsgewebe und dem Biomaterial hinsichtlich knöchernem Einwachs- und Degradationsverhalten beurteilen zu können. Zur Beurteilung des Degradationsverhaltens wurden die Präparate makrophagenspezifisch angefärbt. Hierfür wurde die TRAP und der ED1 Färbung verwendet.

3.4.1 Histologie Tier 3

3.4.1.1 Übersichts- und Detailhistologie Tier 3

Bei Tier 3 zeigte sich in der histologischen Auswertung in der Hämatoxylin-Eosin Färbung ein zum Teil herausgelöstes Knochenersatzmaterial. In der Übersichtsaufnahme (Abbildung 13a) konnte beobachtet werden, dass das Knochenersatzmaterial sich vor allem im zentralen Bereich aus dem Präparat gelöst hatte. Die peripheren Anteile waren vorhanden und zeigten sich in enger Verbindung zum Granulationsgewebe. In der Übersichtsaufnahme stellt sich besonders gut dar, dass das implantierte Knochenersatzmaterial von Granulationsgewebe vollständig umgeben ist. Besonders augenfällig war ein Zellverband im Knochenersatzmaterial, welcher dem Granulationsgewebe ähnelte (Abbildung 13 b). In der Mitte des eingewanderten Gewebes fand sich eine Lakune, deren Rand scharf begrenzt war. Da keine Epithelzellen vorhanden waren, konnte es sich nicht um ein Gefäß handeln. Neben dem Zellverband finden sich auch vereinzelte Zellen im Knochenersatzmaterial (Abbildung 13 b). Auffällig war auch, dass das Knochenersatzmaterial neben den eingewanderten Zellen und am Interface zum Granulationsgewebe dichter und homogener erschien, als das übrige Material (Abbildung 13 b).

In der Toluidinblau-Färbung zeigte sich bei allen vier Ratten ein typischer Aufbau von verschiedenen Gewebsarten, die immer in gleicher Reihenfolge ineinander übergehen. Besonders gut ließen sich die aneinander gelagerten Gewebsschichten bei Tier 3 beobachten. Es zeigte sich in der Übersichtsaufnahme, wie auch in der Hämatoxylin-Eosin Färbung, dass das Knochenersatzmaterial im zentralen Bereich herausgelöst ist (Abbildung 13 c). In der Peripherie liegt jedoch auch hier eine enge Verbindung zum Granulationsgewebe vor (Abbildung 13 d). In Nachbarschaft zum Granulationsgewebe findet sich Knorpel, welcher zu neugebildetem Knochen umgewandelt wird. Dieser grenzt direkt am Lagerknochen an (Abbildung 13 c).

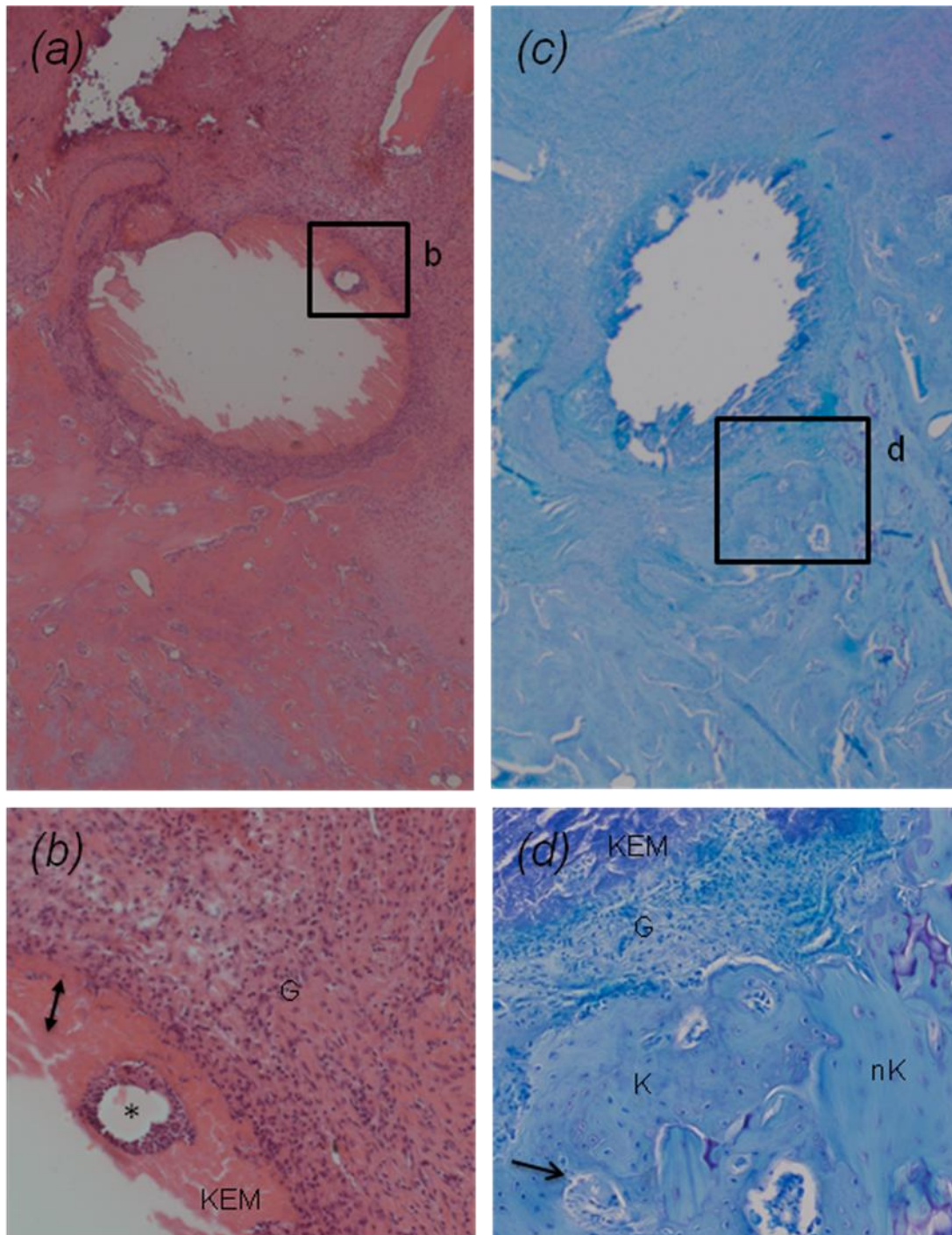


Abbildung 13: Tier 3 (a) mit 2,5-facher Vergrößerung: Lakune im implantierten Knochenersatzmaterial aus Granulationsgewebe, (b) mit 20-facher Vergrößerung homogener und dichter wirkendes Knochenersatzmaterial [KEM] in der Nähe des Granulationsgewebes [G] durch Pfeil mit doppelter Spitze markiert; (c) mit 2,5-facher Vergrößerung Übersichtsaufnahme des Interface zwischen zum größten Teil herausgelöstem Knochenersatzmaterial und Knochen, (d) in 20-facher Vergrößerung Knochenersatzmaterial [KEM], Granulationsgewebe [G], Knorpelgewebe [K] und neugebildeter Knochen [nK] in direkter Nachbarschaft dargestellt

3.4.1.2 Immunhistologie Tier 3

In den immunhistochemischen Färbungen von Tier 3 zeigte sich in der ED1 Färbung eine typische und deutliche Kastanienbraunfärbung als Makrophagennachweis. In dieser Färbung stellte sich das Knochenersatzmaterial vollständig dar. Es kam hier nicht zu einer zentralen Herauslösung durch den Präparationsprozeß (Abbildung 14 a). Die ED1 Färbung zeigt die stärkste Anfärbung im Bereich des Granulationsgewebes. In diesem befinden sich bei Tier 3 drei Lakunen mit einschichtigem Epithel, so dass von Kapillaren auszugehen ist. Im Bereich der Kapillaren zeigten sich vermehrt die ED1-positive Zellen (Abbildung 14 b). Die dargestellten Kapillaren lagen in direkter Nachbarschaft zum Knochenersatzmaterial. Im Knochenersatzmaterial waren eindeutig mehrere Zellen zu detektieren. Diese ließen sich im Gegensatz zu den Makrophagen im Granulationsgewebe jedoch nicht durch die ED1 Färbung anfärben. Auffällig war, dass diese im Knochenersatzmaterial befindlichen Zellen vor allem in der Nähe der Kapillaren vorzufinden waren.

In der zweiten immunhistochemischen Färbung, der TRAP Färbung, zeigte sich eine weniger deutlich positiv ausfallende Färbung. Obwohl sich bei Tier 3 die Morphologie optimal darstellte, zeigten sich nur wenige Zellen in der TRAP-Färbung positiv. Diese befanden sich vor allem im Granulationsgewebe am Rande des Knochenersatzmaterials (Abbildung 14 c). Wie auch in der Toluidinblau- und Hämatoxylin-Eosin Färbung, ließen sich einzelne Zellen im Knochenersatzmaterial selbst identifizieren. Diese zeigten jedoch in dieser Färbung keine kastanienbraune Farbe, wie es bei Makrophagen zu erwarten gewesen wäre (Abbildung 14 d).

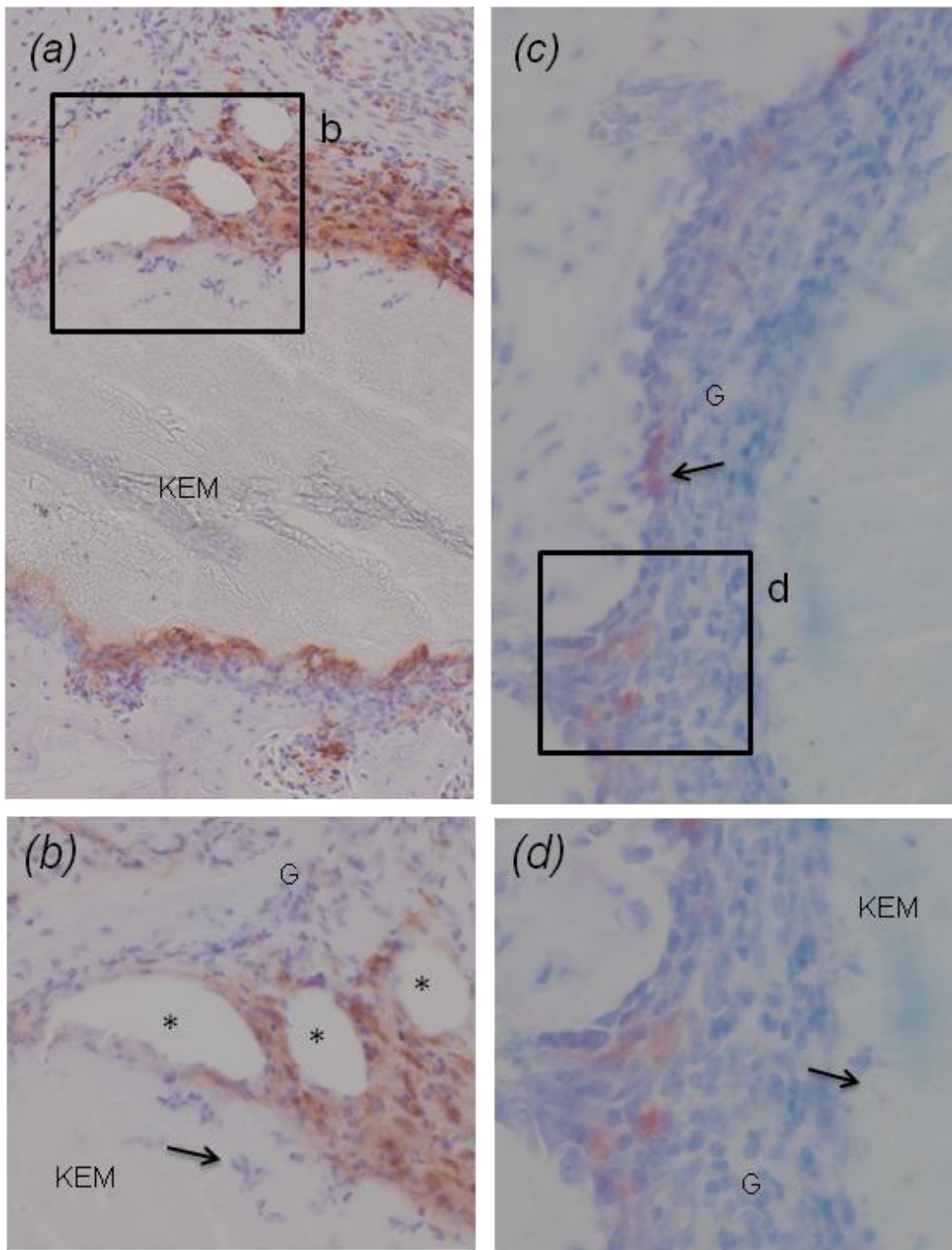


Abbildung 14: Tier 3 (a) in 10-facher Vergrößerung. Darstellung des vollständig erhaltenen Knochenersatzmaterials [KEM] und deutlich positive ED1 Färbung [kastanienbraun] von Makrophagen; (b) in 40-facher Vergrößerung Darstellung von drei Kapillaren [Sterne] umgeben von ED1 positiven Makrophagen [kastanienbraun] sowie Zellen ohne Anfärbung [Pfeil] im Knochenersatzmaterial [KEM]; (c) in 40-facher Vergrößerung TRAP positive Färbung im Granulationsgewebe [G] mit kastanienrot Färbung der Makrophagen [Pfeile] (d). In 60-facher Vergrößerung zeigt sich jedoch keine Anfärbung der Zellen [Pfeil] im Bereich des Knochenersatzmaterials [KEM]

3.4.2 Histologie Tier 8

3.4.2.1 Übersichts- und Detailhistologie Tier 8

In der Hämatoxylin-Eosin Färbung zeigt sich, bei Tier 8 wie auch schon bei Tier 3, dass das Knochenersatzmaterial nicht mehr vollständig vorhanden ist. Bei Tier 8 war jedoch nicht nur ein zentrales Herauslösen des Materials, sondern eine Ablösung des Knochenersatzmaterials vom Granulationsgewebe selbst zu beobachten

(Abbildung 15 a).

Neben den bei einer Frakturheilung üblichen Strukturen wie Makrophagen, Gefäßen und Knorpelzellen fand sich im Granulationsgewebe bei Tier 8 ein kantiges Gewebsfragment, welches nicht fest mit dem umliegenden Gewebe verbunden war (Abbildung 15 b). Die Gewebsstruktur dieses Fragments wirkte dicht und homogen, die Ränder waren scharf begrenzt. Auffällig war außerdem, dass in nächster Umgebung Makrophagen detektiert wurden (Abbildung 15 b).

Ein Vergleich der Struktur des beobachteten Gewebsfragment im Granulationsgewebe mit dem des Knochenersatzmaterials im Frakturspalt zeigte, dass das ursprünglich implantierte Material inhomogener war und weniger dicht erschien

(Abbildung 15 a und b).

In der Toluidinblau Färbung zeigte das Knochenersatzmaterial eine poröse Struktur, die wie lamellärer Knochen aus parallel verlaufenden Bälkchen aufgebaut ist. Zwischen den Bälkchen des Knochenersatzmaterials im Kontaktbereich des Granulationsgewebes ließen sich einzelne Zellen detektiert (Abbildung 15 d). Das Zytoplasma der eingewanderten Zellen ließ sich in der Toluidinblau Färbung besser vom Knochenersatzmaterial abgrenzen als in der Hämatoxylin-Eosin Färbung.

Auch in dieser Färbung zeigt sich bei Tier 8 eine Ablösung des Knochenersatzmaterials vom Granulationsgewebe. Hierbei fällt auf, dass das Granulationsgewebe an einigen Stellen durch den Präparationsprozeß eingerissen wurde (Abbildung 15 c).

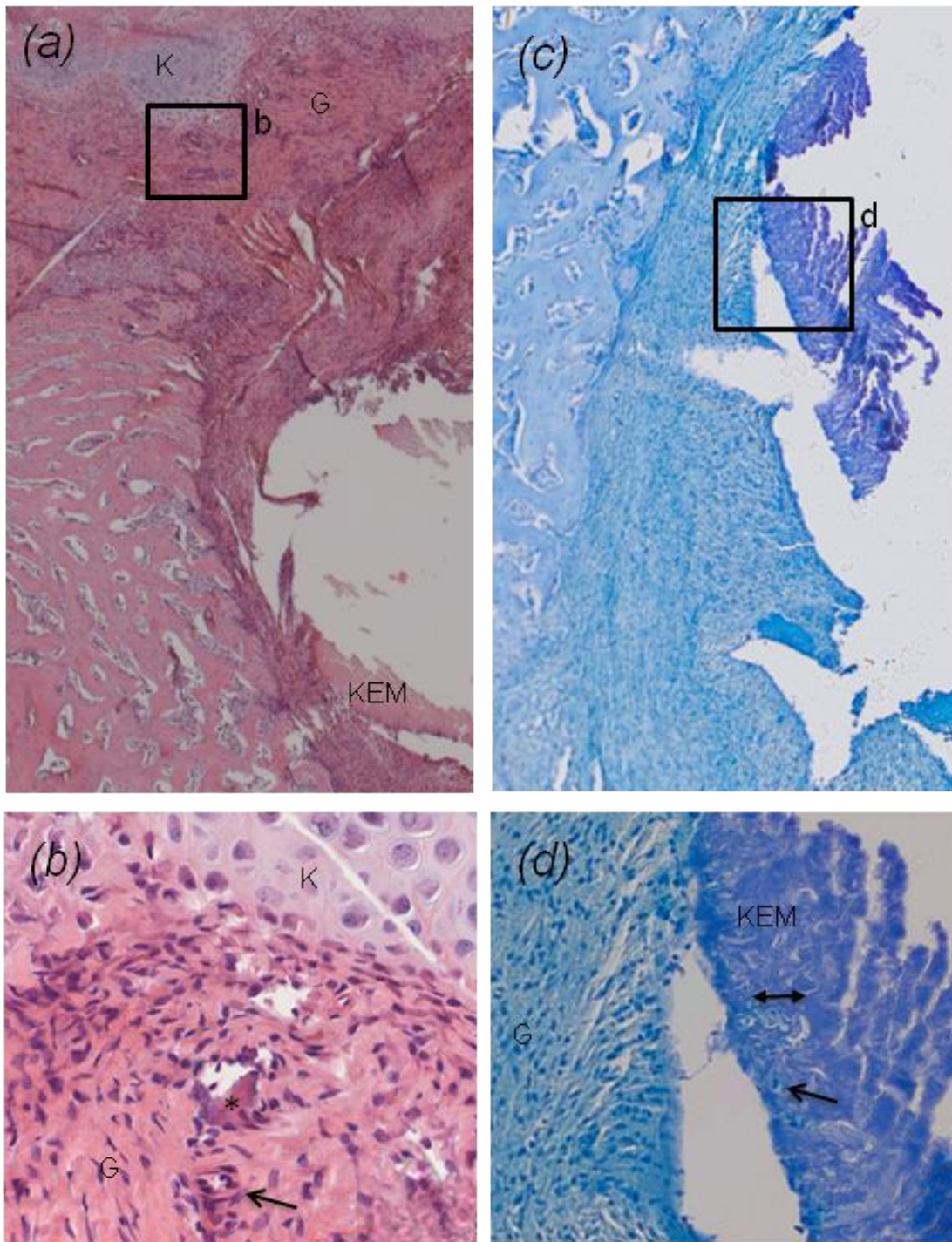


Abbildung 15: Tier 8 (a) mit 5-facher Vergrößerung zum größten Teil abgelöstem Knochenersatzmaterial [KEM] sowie Darstellung des Granulationsgewebe [G] und Knorpel [K] in typischer Anordnung (b), In 40-facher Vergrößerung dargestelltes Fragment [Stern] in der Nähe eines Makrophagen [Pfeil] im Granulationsgewebe [G] in der Nähe zum Knorpelgewebe [K] (c) In 5-facher Vergrößerung vom Granulationsgewebe durch den Präparationsprozeß abgelöstes Knochenersatzmaterial; (d) in 40-facher Vergrößerung Dichte und Homogenitätssteigerung des Knochenersatzmaterials [KEM] in der Nähe des Granulationsgewebes [G] im Vergleich zur Peripherie [doppelter Pfeil] sowie einzelne Zellen [Pfeil].

3.4.2.2 Immunhistologie Tier 8

In den immunhistochemischen Färbungen von Tier 8 differierten die Ergebnisse der Färbung der Schnitte deutlich voneinander. Die ED1 Färbung zeigte ein deutlich positives Ergebnis vor allem im Interfacebereich des Granulationsgewebes, während das Ergebnis bei der TRAP Färbung keinen Nachweis von Makrophagen ergab (Abbildung 16 a und 16 c).

In der ED1 Färbung zeigte sich der deutlich positive Bereich des Granulationsgewebes. Hier lässt sich eine Zunahme der Färbung erkennen, desto näher das Granulationsgewebe an das Knochenersatzmaterial heran reicht. Bei Tier 8 fällt nicht nur auf, dass sich das Knochenersatzmaterial aus dem Gewebeverbund gelöst hat, sondern auch, dass das Granulationsgewebe gegenüber den Knorpelgewebe einen Spalt gezogen hat (Abbildung 16 a).

Im Knochenersatzmaterial selbst zeigen sich in räumlicher Beziehung zum Granulationsgewebe wieder vereinzelte Zellen, welche sich auch bei einer im gesamten Präparat deutlich positiven ED1 Färbung nicht anfärben ließen.

In der TRAP Färbung ließen sich keine TRAP positiven Zellen detektieren. Trotz der nur sehr schwachen Färbung war das Knochenersatzmaterial durch seine kantige Form auszumachen (Abbildung 16 c).

Es war bei der qualitativ schlechten TRAP Färbung im Vergleich zu den anderen erfolgreichen Färbungen kaum aus dem Präparat bei der Herstellung herausgelöst worden. Durch die fast vollständig vorhandene Masse des Knochenersatzmaterials konnte dessen Struktur und Kommunikation zum Granulationsgewebe beurteilt werden.

Das Knochenersatzmaterial verdrängte das Granulationsgewebe so stark, dass es zu einer unnatürlichen Kantenbildung im Granulationsgewebe kam (Abbildung 16 d). Des Weiteren fällt auch hier auf, dass das Knochenersatzmaterial fest mit dem Granulationsgewebe verbunden ist. Die Ablösung findet also nicht zwischen Knochenersatzmaterial und Granulationsgewebe statt, sondern im Granulationsgewebe selbst und zwar in direkter Nähe zum implantierten Material. (Abbildung 16 d).

Das Knochenersatzmaterial selbst zeigt sich in seiner Struktur wie auch bei Tier 3 lamellär aufgebaut. Die Dichte nimmt wie auch schon bei Tier 3 zu beobachten war, in Bezug auf das Granulationsgewebe zu (Abbildung 16 d).

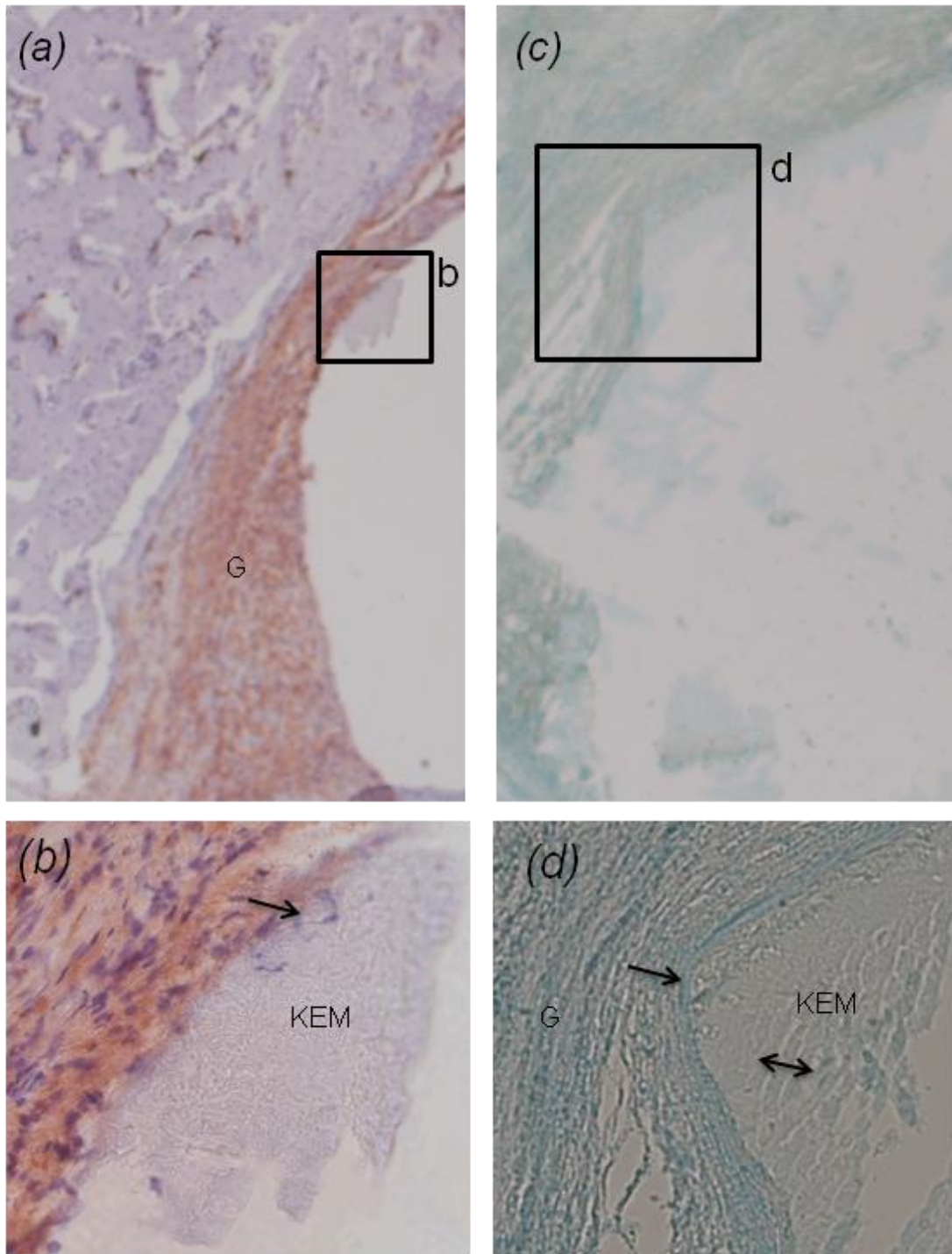


Abbildung 16: Tier 8 (a) in 10-facher Vergrößerung dargestelltes Interface mit zum größten Teil herausgelöstem Knochenersatzmaterial sowie deutlich ED1 positive Anfärbung der im Granulationsgewebe [G] befindlichen Makrophagen; (b) in 40-facher Vergrößerung keine Anfärbung der Zellen [Pfeil] im Knochenersatzmaterial [KEM] ; (c) in 5-facher Vergrößerung nicht zufriedenstellende TRAP Färbung mit einer Übersicht des Interfaces ohne Darstellung von TRAP positiven Zellen; (d) in 20-facher Vergrößerung mit deutlich erkennbarem, kaum herausgelöstem Knochenersatzmaterial [KEM] und kantig [Pfeil] verdrängtem Granulationsgewebe [G]. Knochenersatzmaterial mit Dichtedifferenz [Doppelpfeil]

3.4.3 Histologie Tier 9

3.4.3.1 Übersichts- und Detailhistologie Tier 9

In der Hämatoxylin-Eosin Färbung bei Tier 9 zeigt sich in der Übersichtsaufnahme ein ähnliches Bild wie bei Tier 8 in der TRAP Färbung. Das bei Tier 9 herausgelöste Knochenersatzmaterial hinterlässt eine unnatürlich scharfe Kante im Gewebe (Abbildung 17a).

Des Weiteren zeigt sich bei Tier 9 wie auch schon bei Tier 8 ein homogenes, dichtes Gewebefragment im Granulationsgewebe, umgeben von einer Makrophage (Abbildung 17b). Zwischen dem glatt begrenzten, kantigen Fragment und dem Granulationsgewebe ist, wie bei Tier 8, ein Spalt im Rahmen der Fixierung aufgetreten. Auch hier fällt auf, dass sich das Fragment in einiger Entfernung zur Region des ursprünglich implantierten Knochenersatzmaterials befindet (Abbildung 17a). In nächster Nähe zum Fragment findet sich neben Granulationsgewebe und einer Makrophage auch neugebildeter Knochen. Generell wirkt das Präparat in der Hämatoxylin-Eosin Färbung wie auch in der Toluidinblau Färbung aufgelockert und die Gewebsschichten erscheinen nicht fest miteinander verbunden. Auch das Knochenersatzmaterial ist zum größten Teil herausgelöst und wirkt nicht so dicht und homogen wie bei Tier 3 (Abbildung 13d).

In der Toluidinblau Färbung zeigt sich auch hier die klare Reihenfolge von Knochenersatzmaterial, Granulationsgewebe, neugebildetem Knochen und Lagerknochen. Das abgebildete Knochenersatzmaterial wirkt im Vergleich zum neugebildeten Knochen aufgelockerter, genauso wie die anderen Gewebsschichten (Abbildung 17 d). Im Vergleich zu den bislang dargestellten Übersichten von Gewebsschichten ist bei Tier 8 auffällig, dass neben den generalisiert aufgelockerten Geweben das Granulationsgewebe schmal ist (Abbildung 17d).

In Zusammenschau mit den makroskopischen Ergebnissen, bei denen bei Tier 9 eine intraartikulär liegende Schraube sowie ein locker im Gewebe liegendes Knochenersatzmaterial auffiel, ist die histologische Auflockerung des Gewebes im Rahmen einer Entzündungsreaktion zu werten. Im Rahmen dieser Entzündungsreaktion kommt es zur Permeabilitätssteigerung und damit zu einer histologischen Auflockerung des Gewebes.

In der Darstellung der Gewebsschichten lassen sich in der Toluidinblau Färbung auch bei Tier 9 mehrkernige Zellen detektieren, welche am ehesten als Makrophagen zu werten sind.

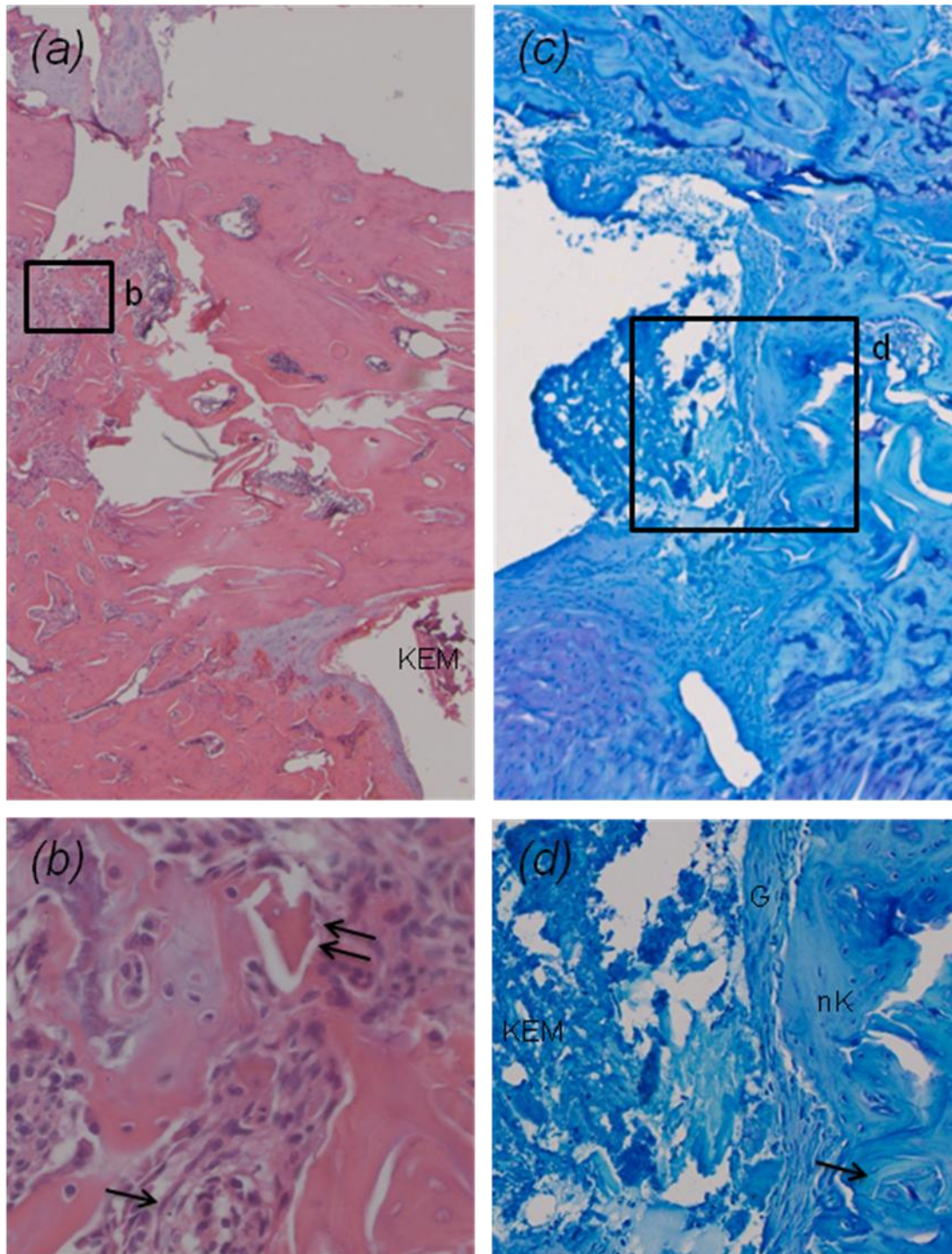


Abbildung 17: Tier 9 (a) in 2,5-facher Vergrößerung Übersicht über Granulationsgewebe und Knochenersatzmaterial [KEM]; (b) in 40-facher Vergrößerung ein Fragment [doppelter Pfeil] umgeben von einer Makrophage [einzelner Pfeil] im Gewebe ; (c) in 2,5-facher Vergrößerung zum größten Teil abgelöstes Knochenersatzmaterial vom Interface; (d) in 40-facher Vergrößerung Darstellung der Verschiedenen Gewebe im Interface: Knochenersatzmaterial [KEM], Granulationsgewebe [G] und neugebildeter Knochen [nK] sowie eine Makrophage [Pfeil]

3.4.3.2 Immunhistologie Tier 9

In den immunhistochemischen Färbungen zeigt sich bei Tier 9 in der ED1 Färbung ein deutlich schwächerer Befund im Vergleich zu Tier 3 und Tier 8. Hier ist das Granulationsgewebe kaum angefärbt. Das Knochenersatzmaterial ist fast vollkommen herausgelöst (Abbildung 18 a). Wenige ED1 positive Zellen finden sich in etwas weiterer Entfernung vom Implantationsort des Knochenersatzmaterials. Hier sind vor allem kastanienbraun angefärbte Zellen im Bezug zu den Kapillaren zu finden. Die ED1 positive Anfärbung befindet sich dicht neben einer Kapillare in Beziehung zu einer Ansammlung von Zellkernen. Es liegt nahe, dass hier eine Makrophage beim Austritt aus einer Kapillare in den Interfacebereich dokumentiert wurde. Des Weiteren zeigt sich in diesem Ausschnitt des Präparates eine mehrkernige Zelle in einigem Abstand zur ED1 positiven Kapillare, welche sich nicht durch ED1 anfärben ließ (Abbildung 18 b).

Bei Tier 9 war in der TRAP Färbung das Knochenersatzmaterial fast vollständig herausgelöst (Abbildung 18 a). Auch zeigte sich fast keine TRAP positive Zelle. Lediglich im Granulationsgewebe ließen sich vereinzelt positive Zellen detektieren. Diese variierten jedoch in ihrer Morphologie von Makrophagen so, dass ein Artefakt bezüglich der TRAP Färbung nicht auszuschließen ist (Abbildung 18 b). Im Vergleich zu den Schnitten der Hämatoxylin-Eosin und Toluidinblau Färbungen des Tieres 9 zeigt sich bei der immunhistochemischen Beurteilung eine deutlich weniger beschädigte Struktur der Gewebsschichten. Gerade in den Übersichtsaufnahmen zeigt sich deutlich der nahezu kreisrunde Defekt, welcher durch das herausgelöste Knochenersatzmaterial entstanden ist. Dieser ist von einer schmalen Schicht von Granulationsgewebe umgeben, welches fließend in das Gewebe des neugebildeten Knochens übergeht (Abbildung 18 c).

Genauso wie in den Standardfärbungen, zeigt sich auch bei den immunhistochemischen Färbungen, dass sich das Knochenersatzmaterial in der eigenen Struktur ablöst und ein schmaler Randsaum am Granulationsgewebe haften bleibt. Dies lässt sich besonders gut in der TRAP Färbungsübersicht beurteilen (Abbildung 18 c).

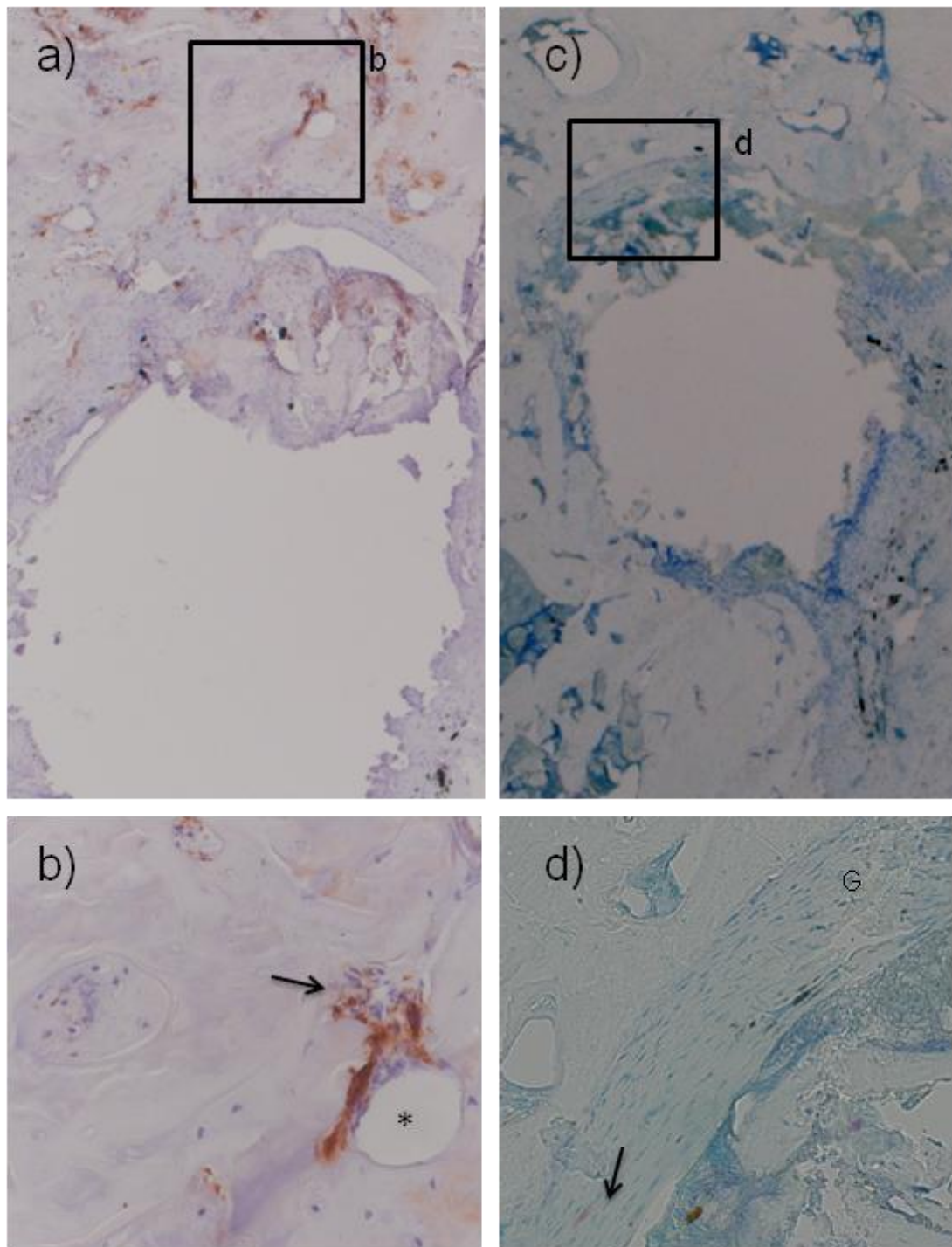


Abbildung 18: Tier 9 (a) in 5-facher Vergrößerung fast vollständig herausgelöstes Knochenersatzmaterial und ED1 positiver Befund [kastanienbraun] im Granulationsgewebe; (b) mit 40-facher Vergrößerung deutlich positive ED1 Anfärbung von Makrophagen [Pfeil] im Bereich einer Kapillare [Stern]; (c) in 2,5-facher Vergrößerung fast vollständig herausgelöstes Knochenersatzmaterial ohne Hinweis für eine erfolgreiche immunhistochemische Anfärbung in der Übersicht; (d) in 40-facher Vergrößerung und nur vereinzelte Anfärbung der Makrophagen [Pfeil] im Granulationsgewebe [G]

3.4.4 Histologie Tier 10

3.4.4.1 Übersichts- und Detailhistologie Tier 10

Bei Tier 10 zeigte sich das Knochenersatzmaterial in den Standardfärbungen wie bei den bereits demonstrierten Tieren fast vollständig herausgelöst, so dass als Übersichtsaufnahme der Bereich des neugebildeten Knorpelgewebes gewählt wurde (Abbildung 19 a und 19 c).

In der Nahaufnahme der Hämatoxylin-Eosin Färbung werden mehrere Makrophagen mit typisch angeordneten Zellkernen sichtbar (Abbildung 19 b). Die Makrophagen finden sich bei Tier 10 in Gruppen am Rande des Knorpelgewebes. Des Weiteren stellt sich in der Nähe einer Kapillare eine Makrophagengruppe dar (Abbildung 19 b). Das gehäufte Vorkommen von Kapillaren in Verbindung mit Makrophagen wurde bereits in den Präparaten der vorangegangenen Tiere demonstriert, genauso wie das Vorkommen von Makrophagen in der Nähe der Knochenersatzmaterial-Fragmente bei Tier 8 und 9 in der Hämatoxylin-Eosin Färbung (Abbildung 17 und 15 b).

Bei Tier 10 fällt in der Hämatoxylin-Eosin Färbung wie auch in der Toluidinblau Färbung auf, dass die Kapillaren in der Frakturzone vor allem in den Grenzbereichen zwischen zwei Gewebsarten auftreten.

In der Toluidinblau Färbung zeigte sich bei Tier 10 eine Lakune am Rande des Knorpelgewebes (Abbildung 19 d). Diese ist im Vergleich zu der Lakune bei Tiere 3 in der Hämatoxylin-Eosin Färbung mit einschichtigem Epithel ausgekleidet. Sie fand sich im Interfacebereich von Granulationsgewebe und Knorpel wieder, so dass hier von einer Kapillare auszugehen ist. Auch findet sich wieder eine Makrophage in direkter Nachbarschaft zur Kapillare (Abbildung 19 d).

In den Übersichtsaufnahmen der Toluidinblau und Hämatoxylin-Eosin Färbungen bei Tier 10 fällt auf, dass sich auch in der Umgebung des Knorpelgewebes viele Kapillaren und Makrophagen befinden.

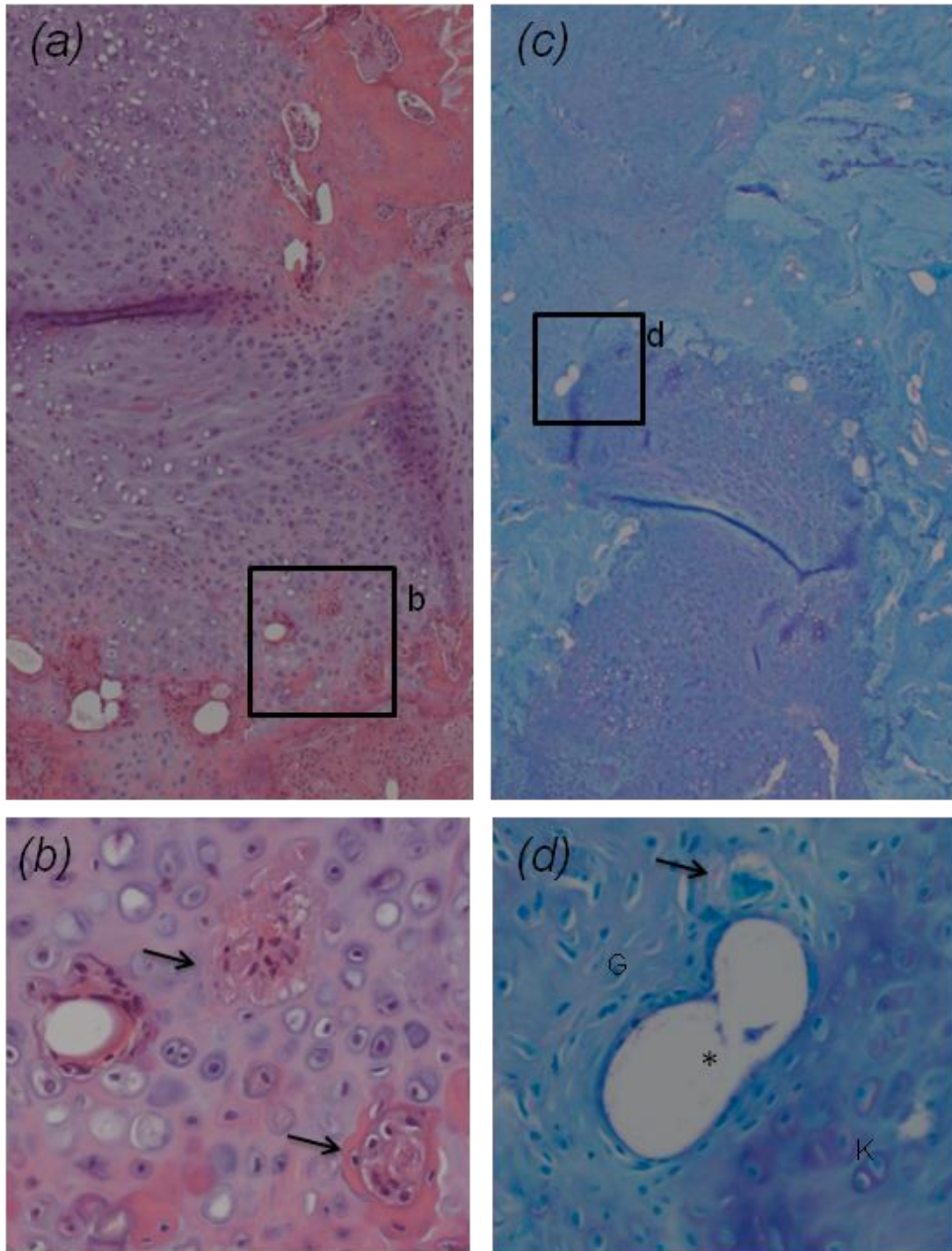


Abbildung 19: Tier 10 (a) in 5-facher Vergrößerung Darstellung von neugebildetem Knorpelgewebe; (b) in 40-facher Vergrößerung eine Lakune [Stern] mit Epithelzellen ausgekleidet in der Nähe von zwei Makrophagen [Pfeile] im Knorpelgewebe; (c) in 2,5-facher Vergrößerung Übersichtsaufnahme des Interfacebereiches von Granulationsgewebe und Knorpel (d) in 40-facher Vergrößerung am Rande von Knorpelgewebe [K] liegender Lakune durch Epithel ausgekleidet [Stern] zwischen Granulationsgewebe (G) und Knorpelgewebe (K) in der direkten Nähe zur Kapillare eine Makrophage [Pfeil]

3.4.4.2 Immunhistologie Tier 10

Die immunhistochemischen Färbungen von Tier 10 weichen gering von denen der vorangegangenen Tiere ab.

In der ED1 Färbung zeigt sich eine spezifisch wirkende Anfärbung von Makrophagen im Bereich des Granulationsgewebes (Abbildung 20 a). Des Weiteren kam es zu einer Anfärbung von Zellen, welche in Lokalisation zum Granulationsgewebe im Knochenersatzmaterial zu detektieren waren. Die ED1 positiven Zellen im Knochenersatzmaterial zeigten sich in dem Bereich des Materials, welches weiterhin fest mit dem Granulationsgewebe in Verbindung stand. Die Ablösung des noch im Präparat vorhandenen Knochenersatzmaterials fand erst in einem Bereich statt, in dem keine Zellen mehr vorzufinden waren (Abbildung 20 b).

Auch in der TRAP Färbung differiert das Ergebnis bei Tier 10 etwas im Vergleich zu den übrigen Tieren. Hier zeigt sich eine deutliche kastanienrote Färbung des Präparates (Abbildung 20 c). Die TRAP positive Färbung zeigt sich nicht nur in direkter Nähe zum herausgelösten Knochenersatzmaterial, sondern auch in einer streifigen, eher unnatürlichen Form über das Präparat verteilt. Das Präparat selbst ist aufgrund der nur geringen Anfärbung wie auch bei den vorherigen TRAP Färbungen nur schwer zu beurteilen. Es wirkt jedoch unschärfer. Zum Teil entsteht der Eindruck, dass Gewebsschichten übereinander gelagert sind. Die Färbung selbst bezieht sich nicht spezifisch auf eine Zelle sondern wirkt über dem Präparat liegend. Es zeigt sich keine TRAP positive Färbung über dem Knochenersatzmaterial (Abbildung 20 d).

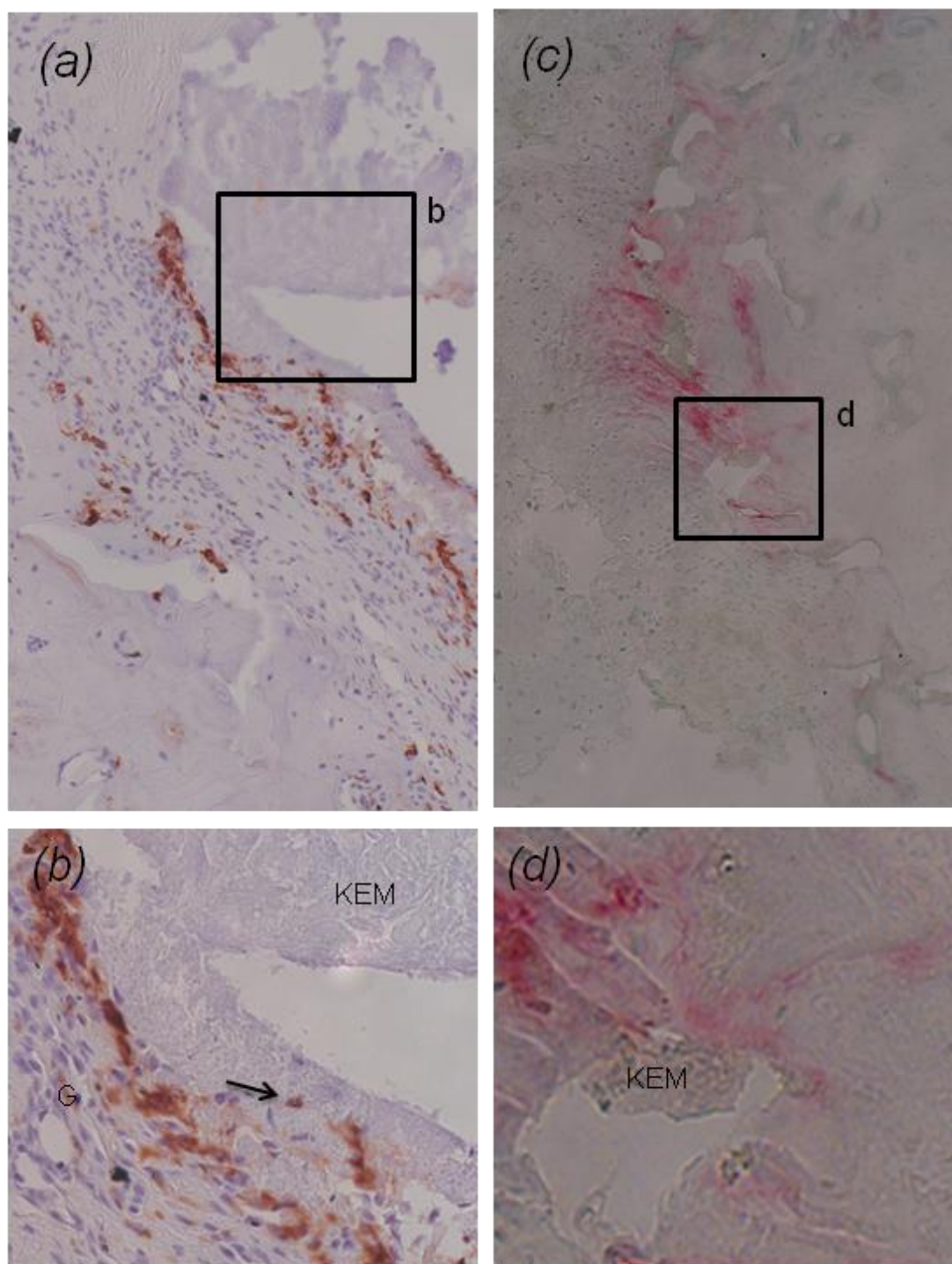


Abbildung 20: Tier 10 (a) in 20-facher Vergrößerung zum Teil abgelöstes Knochenersatzmaterial und deutlich ED1 positive Färbung [kastanienbraun] im Interfacebereich sowie (b) in 40-facher Vergrößerung vereinzelt angefärbte Zellen [Pfeil] im Knochenersatzmaterial [KEM] im Interface; (c) in 10-facher Vergrößerung deutliche Anfärbung von Makrophagen [rotbraun] in der Nähe des Interfacebereiches; (d) in 20-facher Vergrößerung Teile des Knochenersatzmaterials [KEM] in nächster Nähe zur TRAP positiven Färbung.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst ein Frakturdefektmodell an der distalen Femurmetaphyse bei ovarietomierten Ratten etabliert werden, in dem die Verwendung von Biomaterialien untersucht werden können. Des Weiteren sollte der Abbau eines Zweiphasen-Silikat-Kollagen-Konstruktes in diesem Modell getestet werden.

4.1 Tiermodell

Zur Entwicklung eines standardisierten Operationsmodells wurde mit Sprague-Dawley-Ratten gearbeitet, da Ratten neben dem Schaf die am häufigsten in der Literatur beschriebenen Tiere in Bezug auf Induktion einer Osteoporose sind (Lill et al., 2003; Egermann et al., 2005; Egermann et al., 2008; Jakob et al., 2007; Tuner 2002). Im Rahmen der Etablierung einer neuen Operationsmethode wurde bewusst die Entscheidung für die Ratte und gegen das Schaf als Osteoporose-Modell getroffen, denn zum einen ist die Sprague-Dawley-Ratte robuster als das Schaf und zum anderen deutlich kostengünstiger zu halten.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Tiere vom Züchter (Charles River, Sulzfeld) bereits im Alter von 2,5 Monaten ovariectomiert und im Alter von 3 Monaten geliefert. Erst nach weiteren sieben Wochen wurde die Osteotomie durchgeführt und Knochenersatzmaterial implantiert. Im Vergleich zu anderen Studien ist die Zeitspanne zwischen Ovariectomie und Operation deutlich weiter gewählt worden, um dadurch eine längere Zeit der Östrogenminderung mit entsprechender Verminderung der Mineralsalzdichte zu nutzen. In einer vergleichbaren Studie von Stuermer et al. (2010) mit einer Osteotomie an der proximalen Tibia wurde die Ovariectomie zeitgleich mit der Osteotomie durchgeführt. So ist in der vorliegenden Arbeit durch die verlängerte Zeitspanne zwischen Ovariectomie und Osteotomie die Entwicklung eines osteoporotischen Knochenstatus ermöglicht worden. Jedoch wurde in der vorliegenden Arbeit keine Messung der Mineralsalzdichte durchgeführt, so dass keine definitive Aussage über den Knochenstatus getätigt werden kann. Dies ist als Schwäche der Studie anzusehen und sollte in den nächsten Untersuchungen an diesem Modell mit einbezogen werden.

Anzumerken ist jedoch bezüglich der Osteoporoseinduktion weiterhin, dass nicht nur die Dauer der Ovariectomie, sondern auch die Fütterung der Tiere ausschlaggebend ist. Bei den Tieren, die ovariectomiert wurden und im Anschluss mit einer Calcium und Vitamin D freien Diät ernährt wurden, konnte eine signifikante Verminderung des T-

Wertes im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Schlewitz et al., 2013). Daraus ergibt sich, dass in künftigen Studien auch auf die Futterzusammensetzung für die Tiere geachtet werden sollte.

Insgesamt ließ sich die Operationsmethode gut an den Tieren etablieren und es musste nur der Verlust eines Tieres während der Narkoseeinleitung zu der Femuroperation beobachtet werden. Die Tiere nahmen postoperativ an Gewicht zu und verhielten sich unauffällig. Es lässt sich sagen, dass die Ratte ein geeignetes Tiermodell zur Etablierung dieses neuen Operationsmodelles war.

4.2 Operationstechnik

Die Operationsverhältnisse gestalteten sich durch die kleinen Größenverhältnisse an der distalen Femurmetaphyse der Ratte zunächst etwas schwierig, was sich auch an der längeren OP-Zeit der ersten Tiere zeigte. Es gelang jedoch, bei allen dreizehn erfolgreich operierten Tieren eine Osteotomie im trabekulär aufgebauten Bereich eines Röhrenknochens zu setzen.

Es wurde ein relativer großer Defekt mit von ca. 400mm³ mit einer Defektlänge von ca. 5 mm gewählt, um die Implantation des Biomaterials zu ermöglichen. Solch ein Modell existierte bislang nicht in der Literatur.

Die T-förmige Plattenosteosynthese mit einer in der Handchirurgie verwendeten Mini-Platte erwies sich in 11 von 13 Fällen stabil und kann somit generell als stabiles Verfahren angesehen werden. Die Platte war von den Größenverhältnissen des distalen Femurs der Ratte gut angepasst und ließ sich in allen Fällen auf der Lateralseite des Femurs gut fixieren. In den allermeisten Fällen waren sämtliche Schrauben, auch die in der Condylenregion, korrekt positioniert.

Für die Fixation des distalen Fragments am distalen Femur gibt es bei der Ratte keine geeigneten Osteosynthese-Alternativen. Eine Stabilisation mit einem anterograden oder retrograden Marknagel ist aufgrund der Rotationsinstabilität des Kondylenfragments ungeeignet. Die Applikation eines Fixateur-externe ist aufgrund der kleinen Größenverhältnisse ebenfalls nicht sinnvoll.

4.3 Makroskopische Ergebnisse

Die klinisch makroskopische Beurteilung der dreizehn Tiere zeigte bei 11 Tieren eine stabile Osteosynthese, welche die Tiere, subjektiv betrachtet, in den alltäglichen Situationen des Lebens voll belasteten und somit keine Verhaltensänderungen zeigten. Auch zeigte sich insgesamt eine postoperative Steigerung des Körpergewichtes, so dass von einem Wohlbefinden der Tiere ausgegangen werden kann.

Bei einer der beiden instabilen Osteosynthesen kam es zum Plattenbruch. Bei diesem Tier wurde bereits im OP-Protokoll eine nicht pressfit Lage des Knochenersatzmaterials aufgrund eines zu groß gesetzten Osteotomiedefektes dokumentiert. Dies lässt den Schluss zu, dass in diesem Fall eine instabile Situation am Femur vorherrschte, die zum Implantatversagen führte.

Auch die Wundheilung zeigte bei 11 von 13 Tieren keine Komplikationen, so dass die Versorgung der Operationswunde mit einer Naht sowie zusätzlicher Klammerung sich bei den Nagetieren positiv auf die Wundheilung auswirkte.

Bei 2 Tieren kam es zu einer Wundheilungsstörung im Sinne einer Schwellung. Auffällig ist hier, dass gerade bei diesen beiden Tieren es zu einer überdurchschnittlichen guten Gewichtszunahme kam (6% und 7%). Es sollte aufgrund dessen in Erwägung gezogen werden, dass nicht die Gewichtsentwicklung als einziger Parameter für einen komplikationslosen operativen Verlauf heran gezogen wird, sondern immer auch eine explizite Beurteilung der Wundverhältnisse erfolgt.

Bei der Explantation der Femora stellten sich jedoch unerwartet bei einigen Tieren Abweichungen von der gewünschten Implantatlage dar. Es zeigte sich lose liegendes Knochenersatzmaterial und überschießende Bindegewebsproliferationen. Im Gegensatz zur stabilen Osteosynthese zeigt sich bei der Lage des Knochenersatzmaterials bei 4 von 13 Tieren ein locker sitzendes Implantat. Das Knochenersatzmaterial war zum Explantationszeitpunkt nicht mehr pressfit im Kontakt mit den Osteotomie-Rändern. Somit war eine Interaktion zwischen Granulationsgewebe und Knochenersatzmaterial nicht in allen Fällen möglich.

Besonders interessant ist hier der Vergleich der makroskopischen Ergebnisse im Bezug auf die Lage des Knochenersatzmaterials bei Implantation und Explantation. Hier kann kein Zusammenhang postuliert werden. So wird bei der Implantation ein nicht pressfit sitzendes Knochenersatzmaterial beschrieben, welches bei Explantation durch Bindegewebe integriert an korrekter Position sitzt. Jedoch kam es hier zum Plattenbruch. Während bei den anderen drei bei Explantation disloziert liegenden Knochenersatzmaterialien bei Implantation eine pressfit Lage dokumentiert wurde.

4.4 Histologische Ergebnisse

Die histologischen Ergebnisse zeigten, dass eine Interaktion zwischen Knochenersatzmaterial und Granulationsgewebe bei der Frakturdefektheilung bestand. In mehreren Schnitten und bei allen Tieren konnten Zellen im Knochenersatzmaterial detektiert werden. Die Vermutung, dass es sich hierbei um Makrophagen handelte, die nahe an oder in das Knochenersatzmaterial einwanderten um es abzubauen, ließ sich allerdings mithilfe einer TRAP- und/oder ED1-Färbung nicht bestätigen. Es zeigten sich keine Makrophagen positive Färbung im Knochenersatzmaterial, während es im Granulationsgewebe zu einer positiven Färbung kam. Ein Grund für das Ausbleiben der Anfärbung der Zellen im Knochenersatzmaterial und damit deren Identifizierung als Makrophagen könnte sein, dass aufgrund der physikalischen oder chemischen Eigenschaften des Zweiphasenkonstruktes aus Kollagen und Silikat eine spezifische Färbung blockiert wurde.

Für diese Hypothese spricht, dass im Granulationsgewebe Strukturen gefunden wurden, die abgebautes Knochenersatzmaterial darstellen könnten. In der Nähe dieses Materials befanden sich Zellen, die sich schon aufgrund ihrer Morphologie als Makrophagen identifizieren ließen.

Eine Hypothese wäre, dass die Makrophagen hämatogen in das gefäßreiche Granulationsgewebe einwanderten und von dort aus zum Knochenersatzmaterial gelangten. Hier lagern sie im oder sehr dicht am Material, so dass sie sich mit Hilfe der ED1- und TRAP-Färbung nicht anfärben lassen, weil das Knochenersatzmaterial dies verhindert. Die Makrophagen phagozytieren das Knochenersatzmaterial und transportieren es zurück ins Granulationsgewebe. Hier konnte es in umgewandelter Form detektiert werden.

Diese Hypothese könnte weiter untermauert werden, indem Makrophagen *in vitro* gezielt in das Knochenersatzmaterial eingebracht und anschließend eine Färbung mit TRAP oder ED1 durchgeführt werden würden. Aufgrund des Knochenersatzmaterials sollte gemäß der Hypothese eine spezifische Färbung der Makrophagen nicht möglich sein. Dann müsste davon ausgegangen werden, dass Zellen des Granulationsgewebes ins Knochenersatzmaterial eingewandert waren.

Insgesamt zeigt sich eine deutliche Interaktion zwischen Knochenersatzmaterial und dem benachbarten Wirtsgewebe der Ratte. Auch das auffallend häufige Vorkommen von Makrophagen lässt auf einen Versuch des Abbaus des Knochenersatzmaterials schließen. Es lässt sich jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nicht sagen, in wieweit diese Reaktion eine negative Interaktion im Sinne einer aseptischen Fremdkörper-

Entzündungsreaktion darstellt. Hinweise hierfür zeigen die makroskopischen Ergebnisse mit zum Teil überschießenden Reaktionen der Bindegewebsbildung.

Da der neu gebildete Knochen vom Lagerknochen aus in das Granulationsgewebe hineinwächst, wäre es außerdem wichtig herauszufinden, was zu dem Zeitpunkt passiert, zu dem der neue Knochen in Kontakt zum Knochenersatzmaterial kommt. Diese Situation könnte untersucht werden, indem ein längerer Beobachtungszeitraum als 43 Tage verwendet wird. Wahrscheinlich würde es bei einer wie oben diskutierten besseren Kompression des Knochenersatzmaterials zu einer geringeren Bildung von Granulationsgewebe kommen und der neue Knochen und das Knochenersatzmaterial würden dichter beieinander liegen.

Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass das implantierte Knochenersatzmaterial eine Reaktion in der Frakturzone auslöst.

Eine weitere Auffälligkeit bei den histologischen Untersuchungen war, dass sich bei den meisten untersuchten Schnitten das Knochenersatzmaterial durch den Präparationsprozeß deutlich vom Granulationsgewebe gelöst hatte und zum Teil nur noch ein Defekt auffindbar war. Dies lässt darauf schließen, dass das Knochenersatzmaterial nicht fest mit dem umgebenden Granulationsgewebe verbunden war. Man kann davon ausgehen, dass sich die Primärfestigkeit des Materials während der 43 Tage der Implantation nicht verändert hat, da es bei einem elastischen Material nicht zu einem Herausbrechen gekommen wäre. Außerdem zeigte sich bei einem Schnitt in der TRAP Färbung, dass das Knochenersatzmaterial so fest in seiner Form war, dass es das umliegende Gewebe mit einer scharfen Kante verdrängte.

Eine Zusammenschau der histologischen Befunde mit den makroskopischen Ergebnissen zeigt, dass das Zweiphasenkonstrukt, bestehend aus 70 % Silikat und 30 % Kollagen, in den allermeisten Fällen pressfit in den durch Osteotomie geschaffenen Frakturdefekt eingebracht werden konnte und dort in deutliche Interaktion mit dem umliegenden Wirtsgewebe der Ratte trat.

5 Zusammenfassung

Die Verwendung von Biomaterialien stellt in der Behandlung von osteoporotischen Frakturen eine Stimulation der Heilung in Aussicht. Jedoch existieren bislang weder klinisch relevante Kleintiermodelle an der Metaphyse von langen Röhrenknochen noch sind Biomaterialien zur Stimulation der Heilung im metaphysären osteoporotischen Knochen an Kleintiermodellen untersucht worden. Die Zielstellung der aktuellen Arbeit ist erstens die Etablierung eines klinisch relevanten Frakturdefektmodells an der distalen Femurmetaphyse von ovariectomierten Ratten., zweitens soll in diesem Modell das Abbauverhalten eines Silikat-Kollagen-Zweiphasenkonstrukt-Biomaterials histologisch untersucht werden. Bei dreizehn weiblichen ovariectomierten Ratten wurde eine Osteosynthese mit T-Platte am distalen Femur vorgenommen und eine metaphysäre Frakturdefektzone von ca. 400 mm³ bei einer Defektlänge von ca. 5 mm durch eine Osteotomie geschaffen. In diese Defektzone wurde ein Zweiphasenkonstrukt aus 70% Silikat und 30% Kollagen eingebracht. Die Tiere wurden über den Beobachtungszeit von 42 Tagen regelmäßig bzgl. der Wundheilung, Gewichtsentwicklung und Gesamtbefinden untersucht. Nach 43 Tagen wurden die Tiere getötet, das Femur explantiert und makroskopisch untersucht. Anschließend wurden histologische Präparate angefertigt und diese für Hämatoxylin-Eosin-, Toluidinblau-, TRAP- und ED1-Färbung aufgearbeitet. Es wurde nur ein Tier während der Narkose zur Femuroperation verloren. Alle anderen 13 operierten Tiere überstanden die postoperative Beobachtungszeit problemlos mit einem leichten Zugewinn an Körpergewicht. Die Haut- und Wundheilung war bei 11 von 13 Tieren stets unauffällig, bei den beiden anderen Tieren bestanden leichte prolongierte Schwellungszustände. Die Osteosynthese führte bei 11 der 13 Tiere auch 43 Tage postoperativ zu einer stabilen Situation. Somit kann die Osteosynthese über eine T-förmige Plattenosteosynthese in diesem Modell als belastungsstabile Technik bezeichnet werden. Das Zweiphasenkonstrukt zeigte eine deutliche Interaktion mit dem umliegenden Gewebe und wurde in 9 von 13 Fällen zumindest bindegewebig integriert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass dieses Tiermodell die Schaffung eines metaphysären Frakturdefekts an der distalen Femurmetaphyse erlaubt, in dem Biomaterialien untersucht werden können.

6 Summary

Osteoporotic fractures and their treatment remain a challenge. The use of biomaterials intends to stimulate bone healing in this context. However, there is currently a lack of both clinically relevant bone healing small animal models at the metaphyseal part of long bones and the investigation of biomaterials in metaphyseal bone defect healing. The goals of this work are first to establish of a clinically relevant fracture defect model at the distal femoral metaphysis of ovariectomized rats. Second, degradation behaviour of a silicat-collagen-two-phases construct in this metaphyseal fracture defect model is analysed. 13 ovariectomized rats underwent surgery with T-plate fixation at the distal femur with the creation of a metaphyseal defect with a volume of approximately 400 mm³ m and a length of approximately 5 mm by an osteotomy. Second, a silicat-collagen-two-phases construct was implanted into the defect and its degradation behavior was analysed histologically. The animals were followed up for 42 days and wound healing, body weight and general health status was frequently assessed. At day 43, the animals were euthanized and the femora were explanted and assessed macroscopically. Histological slides with hematoxylin-eosin, toluidin blue, TRAP and ED-1 staining were created. 13 of 14 animals survived the entire observation period without problems. Only one animal was lost during anesthesia for the femur surgery. Wound healing was normal in 11 of 13 animals, only 2 animals exhibited prolonged swelling of the knee area. The osteosynthesis was deemed stable in 11 of the 13 animals after 43 days postoperatively. Therefore, the T-plate osteosynthesis at the distal femur in this model can be considered to be stable. The two-phases biomaterial showed multiple tissue interactions with the surrounding host tissue and showed at least soft-tissue integration in the defect. In summary, this animal model enables the creation of a metaphyseal defect in ovariectomized rats in which biomaterials for the enhancement of osteoporotic fracture healing can be investigated.

7 Abkürzungsverzeichnis

BMP	Bone morphogenetic protein
BMU	Basic multicellular unit
ED1	Name des Antikörperclones (CD68)
G	Granulationsgewebe
HE	Hämatoxylin-Eosin
K	Knorpelgewebe
KEM	Knochenersatzmaterial
KG	Körpergewicht
nK	neugebildeter Knochen
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
OPG	Osteoprotegerin
PMMA	Polymethymethacrylat
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor κ B
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand
Tb	Toluidinblau
TRAP	Tartrat-resistente acid Phosphatase

8 Tabellen und Abbildungsverzeichnis

8.1 Tabellen

Tabelle 1: Übersicht der verschiedenen tierexperimentellen, osteoporotischen Frakturmodelle.	12
Tabelle 2: Übersichtstabelle der verschiedenen Untersuchungen in der Auswertungsgruppe	29
Tabelle 3: Übersicht über makroskopische intraoperative und postoperative makroskopische Ergebnisse und der Gewichtsentwicklung in % zum präoperativen Gewicht	33

8.2 Abbildungen

Abbildung 1: Knochenumbau: Osteoklasten resorbieren Knochengewebe und Mineralien. Mononukleäre Zellen wandeln sich in Osteoblasten um, welche neue Knochenmatrix bilden. Die Mineralisierung der Knochenmatrix und die Osteozytenbildung vervollständigen den Remodelingzyklus (aus: Kapinas K, Delany AM 2011).	2
Abbildung 2: Interaktion zwischen Knochenabbau und Knochenaufbau	5
Abbildung 3: Radiologische Darstellung einer Pseudarthrosenbildung mit Versagen des Osteosynthesematerials bei einer methaphysärem Humerusfraktur bei Osteoporose in typischer Lokalisation (Radiologische Abteilung Universitätsklinikum Gießen Marburg, Standort Gießen).	9
Abbildung 4: Knochenersatzmaterial in verschiedenen Zusammensetzungen aus Kollagen/Silikat/Calcium-Phosphat (von links nach rechts: 100/0/0, 90/10/0, 80/20/0, 70/30/0, 60/40/0, 65/30/5, 50/30/20). Das in dieser Studie verwendete Material ist mit einem Pfeil markiert und stellt ein Zwei-Phasenkonstrukt ohne Calcium-Phosphat-Komponente dar. Zur Verfügung gestellt vom Institut für Werkstoffwissenschaften des Max-Bergemann-Zentrums für Biomaterialien in Dresden.....	16
Abbildung 5: 8-Loch Leibinger-Mini-T-Platte nach Kürzung um 2 Loch und Osteosynthese sowie nach 43 postoperativer Explantation des Femurs und der Platte.	17

Abbildung 6: (a) Hautschnitt; (b) Einbringen der Platte; (c) optimale Lage der Platte möglichst condylennah; (d) Osteotomie-Defekt; (e) Defekt versorgt mit pressfit sitzendem Knochenersatzmaterial; (f) Naht und Klammern;	21
Abbildung 7: Darstellung der Gewichtsentwicklung postoperativ.	28
Abbildung 8: Explantiertes Femur der Ratte 3. Biomaterial bindegewebig umbaut, ohne Osteosyntheseplatte stabil	29
Abbildung 9: Explantiertes linkes Femur der Ratte 8; Bindegewebige Überwucherung der Osteosyntheseplatte in stabiler Situation.	31
Abbildung 10: Explantiertes Femur links von Ratte 9 mit stabiler Osteosynthese und mit Bindegewebe umgebener Defekt mit korrekt in situ liegendem Biomaterial	31
Abbildung 11: Explantiertes Femur links von Tier 10 mit Defektbildung durch fehlende Integration des Knochenersatzmaterials und geringer Bindegewebsneubildung.	32
Abbildung 12: (a) Postoperatives CT bei Ratte 9 zeigte die korrekte Lage der Platte, Schrauben und des Knochenersatzmaterial (weißer Pfeil); (b) Postoperatives CT bei Ratte 9 in axialer Schnittebene zeigte Lufteinschlüsse (weiße Doppelpfeile) und die direkte Nähe des Knochenersatzmaterial (weißer Pfeil) zu den Condylen (schwarzer Stern). (Abteilung für Diagnostische Radiologie Universitätsklinikum Gießen-Marburg, Standort Gießen).....	35
Abbildung 13: Tier 3 (a) mit 2,5-facher Vergrößerung: Lakune im implantierten Knochenersatzmaterial aus Granulationsgewebe, (b) mit 20-facher Vergrößerung homogener und dichter wirkendes Knochenersatzmaterial [KEM] in der Nähe des Granulationsgewebes [G] durch Pfeil mit doppelter Spitze markiert; (c) mit 2,5-facher Vergrößerung Übersichtsaufnahme des Interface zwischen zum größten Teil herausgelöstem Knochenersatzmaterial und Knochen, (d) in 20-facher Vergrößerung Knochenersatzmaterial [KEM], Granulationsgewebe [G], Knorpelgewebe [K] und neugebildeter Knochen [nK] in direkter Nachbarschaft dargestellt.....	37
Abbildung 14: Tier 3 (a) in 10-facher Vergrößerung. Darstellung des vollständig erhaltenen Knochenersatzmaterials [KEM] und deutlich positive ED1 Färbung [kastanienbraun] von Makrophagen; (b) in 40-facher Vergrößerung Darstellung von drei Kapillaren [Sterne] umgeben von ED1 positiven Makrophagen [kastanienbraun] sowie Zellen ohne Anfärbung [Pfeil] im Knochenersatzmaterial [KEM]; (c) in 40-facher Vergrößerung TRAP positive Färbung im Granulationsgewebe [G] mit kastanienrot Färbung der Makrophagen [Pfeile] (d). In 60-facher Vergrößerung zeigt sich jedoch keine Anfärbung der Zellen [Pfeil] im Bereich des Knochenersatzmaterials [KEM].....	39

Abbildung 15: Tier 8 (a) mit 5-facher Vergrößerung zum größten Teil abgelöstem Knochenersatzmaterial [KEM] sowie Darstellung des Granulationsgewebe [G] und Knorpel [K] in typischer Anordnung (b), In 40-facher Vergrößerung dargestelltes Fragment [Stern] in der Nähe eines Makrophagen [Pfeil] im Granulationsgewebe [G] in der Nähe zum Knorpelgewebe [K] (c) In 5-facher Vergrößerung vom Granulationsgewebe durch den Präparationsprozeß abgelöstes Knochenersatzmaterial; (d) in 40-facher Vergrößerung Dichte und Homogenitätssteigerung des Knochenersatzmaterials [KEM] in der Nähe des Granulationsgewebes [G] im Vergleich zur Peripherie [doppelter Pfeil] sowie einzelne Zellen [Pfeil].....	41
Abbildung 16: Tier 8 (a) in 10-facher Vergrößerung dargestelltes Interface mit zum größten Teil herausgelöstem Knochenersatzmaterial sowie deutlich ED1 positive Anfärbung der im Granulationsgewebe [G] befindlichen Makrophagen;(b) in 40-facher Vergrößerung keine Anfärbung der Zellen [Pfeil] im Knochenersatzmaterial [KEM] ; (c) in 5-facher Vergrößerung nicht zufriedenstellende TRAP Färbung mit einer Übersicht des Interfaces ohne Darstellung von TRAP positiven Zellen; (d) in 20-facher Vergrößerung mit deutlich erkennbarem, kaum heraus gelöstem Knochenersatzmaterial [KEM] und kantig [Pfeil] verdrängtem Granulationsgewebe [G]. Knochenersatzmaterial mit Dichtedifferenz [Doppelpfeil]	43
Abbildung 17: Tier 9 (a)in 2,5-facher Vergrößerung Übersicht über Granulationsgewebe und Knochenersatzmaterial [KEM]; (b) in 40-facher Vergrößerung ein Fragment [doppelter Pfeil] umgeben von einer Makrophage [einzelner Pfeil] im Gewebe ; (c) in 2,5-facher Vergrößerung zum größten Teil abgelöstes Knochenersatzmaterial vom Interface; (d) in 40-facher Vergrößerung Darstellung der Verschiedenen Gewebe im Interface: Knochenersatzmaterial [KEM], Granulationsgewebe [G] und neugebildeter Knochen [nK] sowie eine Makrophage [Pfeil]	45
Abbildung 18: Tier 9 (a) in 5-facher Vergrößerung fast vollständig herausgelöstes Knochenersatzmaterial und ED1 positiver Befund [kastanienbraun] im Granulationsgewebe; (b) mit 40-facher Vergrößerung deutlich positive ED1 Anfärbung von Makrophagen [Pfeil] im Bereich einer Kapillare [Stern]; (c) in 2,5-facher Vergrößerung fast vollständig herausgelöstes Knochenersatzmaterial ohne Hinweis für eine erfolgreiche immunhistochemische Anfärbung in der Übersicht; (d) in 40-facher Vergrößerung und nur vereinzelte Anfärbung der Makrophagen [Pfeil] im Granulationsgewebe [G]	47

Abbildung 19: Tier 10 (a) in 5-facher Vergrößerung Darstellung von neugebildetem Knorpelgewebe; (b) in 40-facher Vergrößerung eine Lakune [Stern] mit Epithelzellen ausgekleidet in der Nähe von zwei Makrophagen [Pfeile] im Knorpelgewebe; (c) in 2,5-facher Vergrößerung Übersichtsaufnahme des Interfacebereiches von Granulationsgewebe und Knorpel (d) in 40-facher Vergrößerung am Rande von Knorpelgewebe [K] liegender Lakune durch Epithel ausgekleidet [Stern] zwischen Granulationsgewebe (G) und Knorpelgewebe (K) in der direkten Nähe zur Kapillare eine Makrophage [Pfeil]49

Abbildung 20: Tier 10 (a) in 20-facher Vergrößerung zum Teil abgelöstes Knochenersatzmaterial und deutlich ED1 positive Färbung [kastanienbraun] im Interfacebereich sowie (b) in 40-facher Vergrößerung vereinzelt angefärbte Zellen [Pfeil] im Knochenersatzmaterial [KEM] im Interface; (c) in 10-facher Vergrößerung deutliche Anfärbung von Makrophagen [rotbraun] in der Nähe des Interfacebereiches; (d) in 20-facher Vergrößerung Teile des Knochenersatzmaterials [KEM] in nächster Nähe zur TRAP positiven Färbung. ..51

9 Literaturverzeichnis

Adam P, Nebelung AO, Vogt M. 1998.

Löslichkeit und Umwandlung biokeramischer Schichten. *Zahnärztliche Implantologie*. 1988; 4:15-21.

Bierbaum S, Beutner R, Hanke T, Scharnweber D, Hempel U, Worch H. 2003.

Modification of Ti6Al4V surfaces using collagen I,III and fibronectin I. Biochemical and morphological characteristics of the adsorbed matrix. *J Biomed Mater Res A*. 2003; 2:421-30.

Bonnarens F, Einhorn TA. 1984.

Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *Journal of Orthopaedic Research*. 1984; 2:97-101.

Chandler HP, King D, Limbird R, et al., 1993.

The use of cortical allograft struts for fixation of fractures associated with well-fixed total joint prostheses. *Semin Arthroplasty*. 1993; 4:99-107.

Compson J. 2010.

Osteoporosis: social and economic impact. *Radiol Clin North Am*. 2010; 48:477-82.

Cooper C, Campion G, Melton LJ., 1992.

Hip fractures in the elderly: a world wide projection. *Osteoporos Int*. 1992; 2:285-9.

Dachverband, Osteologie. 2009.

Dachverband Osteologie. [Online] April 2009. [Zitat vom: 14. 04 2013.] http://www.dv-osteologie.org/uploads/leitlinien/DVO-Leitlinie%202009%20Langfassung_Druck.pdf.

DeGroot. 1988.

Bioceramics consisting of calcium phosphat salts. *Biomaterials*. 1988; 1: 47-50.

Dhanwal DK, Cooper C, Dennison EM. 2010.

Geographic Variation in Osteoporotic Hip Fracture Incidence: The Growing Importance of Asia Influences in Coming Decades. *Journal of Osteoporosis*. 2010; 45(1):15-22

Draenert K, Wiese FG, Garde U, Draenert Y, Helbert U, Börner M. 2001.
Synthetische Knochenersatzwerkstoffe auf HA- und TCP-Basis. *Trauma Berufskrankh.* 2001; 3:293-300.

Egermann M, Goldhahn J, Holz R, Schneider E, Lill CA. 2008.
A sheep model for fracture treatment in osteoporosis benefits of the model versus animal welfare. *Lab Anim.* 2008; 42:453-64.

Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. 2005.
Animal models for fracture treatment in osteoporosis.
Osteoporos Int. 2005; 16:129-38.

Egermann M, Heil P, Tami A, Ito K, Janicki P, Von Rechenberg B, Hofstetter W, Richards PJ. 2010.
Influence of defective bone marrow osteogenesis on fracture repair in an experimental model of senile osteoporosis. *J Orthop Res.* 2010; 6:798-804.

Einhorn, TA. 1998.
The cell and molecule healing biology of fr. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 1998; 355:7-21.

Fernández-Tresquerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, Del-Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. 2006.
Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006; 11:151-7.

Francisco JI, Yu Y, Oliver RA et al. 2011.
Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats. *J Orthop Res.* 2011; 29:189-196.

French DL, Muir JM, Webber CE. 2008.
The ovariectomized, mature rat model of postmenopausal osteoporosis: an assesment of the bone sparing effects of crucumin. *Phytomedicine.* 2008; 15:1069-1078.

Gerlinsky M, Heinemann. 2010.
Nanocomposites for tissue engineering. *Kumar CSSR (ed) Nanocomposites for the life sciences. Wiley-VCH, Weinheim.* 2010; 405-34.

Giannoudis P, Tzioupis C, Almalki T, Buckley R,. 2007.

Fracture healing in osteoporotic fractures: Is it really different?: A basic science perspective. *Injury*. 2007; 38:90-9.

Goodman SB, Bauer TW, Carter D, et al,. 1998.

Norian SRS cement augmentation in hip fracture treatment. Laboratory and initial clinical results. *Clin Orthop Relat Res*.1998; 348:42-50.

Govindarajan P, Schlewitz G, Schlieke N, Weisweiler D, Alt V, Thormann U, Lips K, Wenisch S, Langheinrich A, Zahner D, Hemdan N, Böcker W, Schnettler R. 2013.

Implications of combined Ovariectomy/Multi-Deficiency Diet on rat bone with age-related variation in Bone Parameters and Bone Loss at Multiple Skeletal Sites by DEXA. *Med Sci Monit Basic Res* . 2013; 19:76-86.

Griffin XL, Smith CM, Costa ML. 2009.

The clinical use of platelet rich plasma in the promotion of bone healing a systematic review. *Injury*. 2009; 40:158-62.

Günther KP, Scharf HP, Pesch HJ, Puhl W. 1998.

Einwachsverhalten von Knochenersatzstoffen -tierexperimentelle Untersuchung. *Orthopäde*. 1998; 27:105-17.

Hao YJ, Zhang G, Wang YS, Oin L, Hung WY, Leung K, Pei PX. 2007.

Changes of microstructure and mineralized tissue in the middle and the late phase of osteoporotic fracture healing in rats. *Bone*. 2007; 41:631-8.

Hatano H, Siegel HJ, Yamagiwa H, Bronk JT, Turner RT, Bolander ME, Sarkar G. 2004.

Identification of estrogen related genes during fracture healing using DANN microarray. *J Bone Miner Metab*. 2004; 22:224-35.

Häussler B., Gothe H., Göl D., Glaeske G., Pientka L., Felsenber D.,. 2007.

Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study. *Osteoporos Int*. 2007; 18:77-84.

Heinemann C, Heinemann S, Worch H, Hanke T. 2011.

Development of an Osteoblast/Osteoclast co-culture derived ny human bone marrow stromal cells and human monocytes for biomaterials testing. *European Cells and Materials*. 2011; 20:80-93.

Heinemann S, Coradin T, Worch H, Wiesmann HP, Hanke T. 2011.

Possibilities and limitations of preparing silica/collagen/hydroxyapatite composite xerogels as load-bearing biomaterials. *Composites Sience and Technology*. 2011; 71:1873-80.

Heinemann S, Gelinsky M, Worch H, Hanke T. 2011a.

Resorbierbare Knochenersatzmaterialien. *Der Orthopäde*. 2011; 40:761-73.

Heinemann S, Heinemann C, Bernhardt R, Reinstorf A, Nies B, Meyer M, Worch H, Hanke T. 2009.

Bioactive silicat-collagen composite xerogels modified by calcium phosphate phases with adjustable mechanical properties for bone replacement. *Acta Biomaterialia*. 2009; 5:1979-90.

Heinemann S, Heinemann C, Ehrlich H, Meyer M, Baltzer H, Worch H et al. 2007.

A novel biomimetic hybrid material made of sillisified collagen: perspective for bone replacement. *Adv Eng Mater*. 2007; 9:1061-8.

Henriksen K, Sorensen MG, Nielsen RH, Gram J, Schaller S, Dziegiel MH, Everts V, Bollerslev J, Karsdal MA. 2006.

Degradation of the organic phase of bone by osteoclasts a secondary role for lysosomal acidification. *Journal of bone and mineral resaerch the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2006; 21:58-66.

Heppenstall, RB. 1980.

Frakture Treatment and Healing. [Buchverf.] WB Saunders. Philadelphia. 1980.

Histing T Anton C, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M et al. 2012.

Melatonin impairs fracture healing by supressing RANKL-mediated bone remodeling. *J Surg Res*. 2012; 173: 83-90.

Hollinger JO, Onikepe AO, MacKrell J, et al., 2008.

Accelerated fracture healing in the geriatric, osteoporotic rat with recombinant human platelet-derived growth factor-BB and an injectable beta-tricalcium phosphate/collagen matrix. *J Orthop Res.*, 2008; 26:83-90.

Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T. 2007a. Development of a locking femur nail for mice. *J Biomech.* 2007; 40:215-9.

Holstein JH, Menger MD, Scheuer C, Meier C, Culemann U, Wirbel RJ, et al., 2007b.

Erythropoetin (EPO): EPO-receptor signaling improves early endochondral ossification and mechanical strength in fracture healing. *Life Sci.* 2007; 80:893-900.

Hong YH, Hishikawa D, Miyahara H, Tsuzuki H, Nishimura Y, Gotoh C, Choi KC, Hokari Y, Takagi Y, Lee HG, Cho KK, Roh SG, Sasaki S.

Up-regulation of adipogenin an adipocyte plasma transmembrane protein, during adipogenesis. 2005. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2005; 276:133-41.

Hughes DE, Boyce BF. 1997.

Apoptosis in bone physiology and disease. *Molecular Pathology.* 1997; 50:132-7.

Islam AA, Rasubala L, Yoshikawa H, Shiratsuchi Y, Ohishi M., 2005.

Healing of fractures in osteoporotic rat mandible shown by the expression of bone morphogenetic protein-2 and tumor necrosis factor-alpha. *The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery.* 2005; 43:383-91.

Ito M, Nishida A, Nakamura T et al. 2002.

Differences of three-dimensional trabecular microstructure in osteopenic rat models caused by ovariectomy and neurectomy. *Bone.* 2002; 30:594-8.

Jakob FJ, Seefried L, Ebert R, Eulert J, Wolf E, Schieker M, Boecker W, Mutschler W, Amling M, Pogoda P, Schinke T, Liedert A, Blakýtny R, Ignatius A, Claes L. 2007.

Fracture healing in osteoporosis. *Osteol.* 2007; 16:71-84.

Jee WS, Yao W. 2001.

Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2001; 1:193-207.

Kapinas K, Delany AM. 2011.

MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. *Arthritis Res. Ther.* 2011; 13:220.

Karsenty G, Wagner EF. 2002.

Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Developmental Cell.* 2002; 2:389-406.

Kasra M, Gryn timer MD. 1994.

Effect of long-term ovariectomy on bone mechanical properties in young female cynomolgus monkeys. *Bone.* 1994; 15:557-61.

Kohal R, Trejo PM, Wirsching C, Huerzeler MB. 1999.

Comparison of bioabsorbable and bioinert membranes for guided bone regeneration around non-submerged implants. An experimental study in the mongrel dog. *Clinical Oral Implants Research.* 1999; 226-37.

Kohal, RJ. 1997.

Knochenersatzmaterial in der Parodontologie und zahnärztliche Implantologie. *Zahnärztl Mitt.* 1997; 8:56-61.

Kolios L, Hoerster A, Sehmisch S, Malcherek M, Rack T, Tezval M, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W, Stuermer K, Stuermer E. 2010.

Do Estrogen and Alendronate improve metaphyseal fracture healing when applied as osteoporosis prophylaxis? *Calified tissue international.* 2010; 86:23-32.

Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. 1999.

OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph node organogenesis. *Nature.* 1999; 397:315-23.

Krischak GD, Augat P, Sorg T, Blakytyn R, Kinzl L, Claes L, et al., 2007.

Effects of diclofenac on periosteal callus manuration in osteotomy healing in an animal model. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*. 2007; 127:3-9.

Kubo T, Shiga T, Hashimoto J, Yoshioka M, Honjo H, Urabe M et al. 1999.

Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a ratmodel prepared by ovariectomy and low calcium diet. *Steroid Biochem Mol Biol*. 1999; 68:197-202.

Li C, Mori S, Li J, Kaji Y, Akiyama T, Kawanishi J, Norimatsu H. 2001a.

Long term effect of incadronate disodium (YM-175) on fracture healing of femoral shaft in growing rats. *J Bone Miner Res*. 2001; 16:429-36.

Li J, Mori S, Kaji Y, Akiyama T, Norimatsu H. 2001b.

Concentration of bisphosphonate (incadronat) in callus area and its effects on fracture healing in rats. *J Bone Miner Res*. 2001; 15:2042-51.

Li M, Liu X, Ge B., 2010.

Calcium phosphate cement with BMP-2-loaded gelatin microspheres enhances bone healing in osteoporosis: a pilot study.

Clin Orthop Relat Res. 2010; 468:1978-85.

Lill CA, Gerlach UV, Eckhardt C et al. 2002.

Bone changes due to glucocorticoid application in an ovariectomized animal model for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2002; 13:407-14.

Lill CA, HesseIn J, Schlegel U, Eckhardt C, Goldhahn J, Schneider E. 2003.

Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2003; 21:836-42.

Maes C, Kobayashi T, Kronenberg HM. 2007.

A novel transgenic mouse model to study the osteoblast lineage in vivo. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007; 1116:149-64.

Martin RB, Butcher RL, Sherwood LL, Buckendahl P, Boyd RD, Farris D, Sharkey N, Dannucci G. 1987.

Effects of ovariectomy in beagle dogs. *Bone*. 1987; 8:23-31.

McCann RM, Colleary G, Geddis C, Clarke SA, Jordan GR, Dickson GR, Marsh D. 2008.

Effect of osteoporosis on bone mineral density and fracture repair in rat femoral fracture model. *J Ortop Res.* 2008; 26:384-93.

Meyer RA, Jr Tsahakis PJ, Martin DF, Banks DM, Harrow ME, Kiebzak GM. 2001.

Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. *Journal of Orthopaedic Research.* 2001; 19:428-35.

Monfoulet L, Rabier B, Chassande O, Fricain JC. 2010.

Drilled hole defects in mouse femur as models of intramembranous cortical and cancellous bone regeneration. *Calcified Tissue International.* 2010; 28:423-29.

Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S. 2007.

Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell.* 2007; 130:811-23.

Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Hao Lin J, Maastricht S, Swain M, et al. 2001.

Osteoporosis influences the early period of fracture healing in ovariectomized rats. *Bone.* 2001; 28:80-6.

Patwardhan SV, Clarson SJ, Perry CC. 2005.

On the role(s) of additives in bioinspired silicification. *Chem Commun (Camb).* 2005; 7:1113-21.

Pearce AJ, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. 2007. Animal models for implant biomaterial research in bone a review. *European Cells & Materials.* 2007; 13:1-10.

Peng Z, Tuukkanen J, Zhang H, Jämsä T, Väänänen HK. 1994.

The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. *Bone.* 1994; 15:523-32.

Qiao L, Xu KH, Liu HW, Lin HQ. 2005.

Effects of ovariectomy on fracture healing in female rats. *Journal of Sichuan University Medical Science Edition*. 2005; 36:108-11.

Raggatt LJ, Partridge NC. 2010.

Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285:25103-8.

Raisz, LG. 1999.

Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling. *Clinical Chemistry*. 1999; 45:1353-8.

Rajan GP, Fornaro J, Trentz O, et al., 2006.

Cancellous allograft versus autologous bone grafting for repair of comminuted distal radius fracture: prospective, randomized trial. *J Trauma*. 2006; 60:1322-9.

Reginster JY, Burlet N., 2006.

Osteoporosis: a still increasing prevalence. *Bone*. 2006; 38:4-9.

Schlewitz G, Govindarajan P, Schlifke N, Alt V, Böcker W, ElKhassawna T, Thormann U, Lips KS, Hemdan NY, Zahner D, Schnettler R, Heiss C. 2013.

Ovarektomie und Kalzium/Vitamin D2/D3 -arme Diät als Osteoporosemodell an der Wirbelsäule von Sprague-Dawley-Ratten. *Z Orthop Unfall*. 2013; 151:14-9.

Schnettler R, Alt V, Dingeldein E, Pfefferle HJ, Kilian O, Meyer C, Heiss C, Wenisch S. 2003.

Bone in growth in bFGF-coated hydroxyapatite ceramic implants. *Biomaterials*. 2003; 24:4603-8.

Schnettler R, Pfefferle HJ, Kilian O, Heiss C, Kreuter J, Lommel D, Pavlidis T, Stahl JP, Meyer C, Wenisch S, Alt V. 2005.

Glycerol-lactide coating polymer leads to delay in bone ingrowth in hydroxyapatite implants. *J Control Release*. 2005; 106:154-61.

Shen V, Dempster DW, Birchman R, Mellish RW, Church E, Kohn D, Lindsay R. 1992.

Lack changes in histomorphometric, bone mass, and biochemical parameters in ovariectomized dogs. *Bone*. 1992; 13:311-6.

Steen H, Fjeld TO. 1989.

Lengthening osteotomy in the metaphysis and diaphysis. An experimental study in the ovine tibia. *Clin Orthop Relat Res*. 1989; 247:297-305.

Stuermer EK, Sehmsch S, Rack T, Wenda E, Seidlova-Wuttke D, Tezval M, Wuttke W, Frosch KH, Stuermer KM. 2010.

Estrogen and raloxifene improve metaphyseal fracture healing in the early phase of osteoporosis. A new fracture healing model at the tibia rat. *Langenbecks Arch Surg*. 2010; 395:163-72.

Tarantino U, Cerocchi I, Scialdoni A, Saturnino L, Feola M, Celi M, et al.,. 2011.

Bone healing and osteoporosis. *Aging Clinical and Experimental Research*. 2011; 23:62-4.

Tuner, S. 2002.

The sheep as a model for osteoporosis in humans. *Vet J*. 2002; 163:232-9.

Urist, MR. 1995.

Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1995; 150:893-9.

Uusitalo H, Rantakokko J, Ahonen M, Jamsa T, Tuukkanen J, KaHari V et al. 2001.

A metaphyseal defect model of femur for studies of murine bone healing. *Bone*. 2001; 28:423-9.

Veitch SW, Stround RM, Toms AD,. 2010.

Compaction bone grafting in tibial plateau fracture fixation. *J Trauma*. 2010; 68:980-3.

Villanueva AR, Sypitkowski C, Parfitt AM. 1986.

A new method for identification of cement lines in undecalcified, plastic embedded sections of bone. *Stain Technology*. 1986; 61:83-8.

Wang JW, Li W, Xu SW, Yang DS, Wang Y, Lin M, et al., 2005.

Osteoporosis influences the middle and late periods of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Chinese journal of traumatology= Zhonghua chuang shang za zhi/Chinese Medical Association*. 2005; 8:111-6.

Weinkamer R, Hartmann MA, Brechet Y, Fratzl P., 2005.

Architectural changes of trabecular bone caused by the remodeling process. *Materials Research Society Symposium Proceedings*. 2005; 874:67-72

World Health, Organisation.

Assessment of fracture risk and its implication to screening for postmenopausal osteoporosis:.. *Technical report series 843*. Geneva: WHO, 1994.

Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC, Ignaszewski LA 1985.

Skeletal alterations in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* . 1985; 37:324-8.

Wüster C, Engels K, Renner EL, Hesch RD, Hadji P, Pourfard JY,. 1998.

Meßwertinterpretation in der Osteodensitometrie. *Deutsches Ärzteblatt*, 1998; 95:2547-51.

Xu SW, Wang JW, Li W, Wang Y, Zhao GF. 2004.

Osteoporosis impairs fracture healing of tibia in rat osteoporotic model. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2004; 84:1205-9.

Xu SW, Yu R, Zhao GF, Wang JW,. 2003.

Early period of fracture healing in ovariectomized rats. *Chinese journal of traumatology= Zhonghua chuang shang za zhi/Chinese Medical Association*. 2003; 6:160-66.

Yamada S, Heymann D, Bouler JM, Daculsi G. 1997.

Osteoclastic resorption of biphasic calcium phosphat ceramic in vitro. *J Biomed Mat Res*. 1997; 37:346-52.

10 Publikationsverzeichnis

Alt V, Kögelmaier DV, Lips KS, Witt V, Pacholke S, Heiss C, Kampschulte M, Heinemann S, Hanke T, Schnettler R, Langheinrich AC: Assessment of angiogenesis in osseointegration of a silica-collagen biomaterial using 3D-nano-CT. *Acta Biomater* 2011Oct(10):3773-9

11 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Roßdorf, 11.September 2015

Vera Hanstein

12 Danksagung

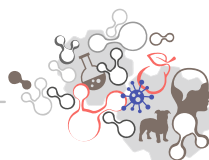
Ein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Volker Alt für seine Betreuung und Unterstützung bei der vorliegenden Arbeit und Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. R. Schnettler sowie Prof. Dr. C. Heiß für die Überlassung des Themas.

Des Weiteren bedanke ich mich bei dem Team für experimentelle Unfallchirurgie in Gießen für die Hilfe bei all meinen Fragen und für das Ermöglichen der Durchführung dieser Arbeit. Dieser Dank gilt insbesondere Frau Prof. Dr. Katrin Lips und Herrn Rainer Braun.

Ein weiteres Dankeschön geht an die Tierpfleger des Zentralen Tierlabors in Gießen und Herrn Dr. Daniel Zahner für die hervorragende Betreuung der Tiere.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Mann, meinem Bruder und meinen Freunden, insbesondere Philipp Stephan, für die motivierenden Worte und die wertvolle Unterstützung bei meinen Problemen mit der EDV bedanken.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin in diesem Rahmen ermöglicht haben.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6455-6



9 17 8 3 8 3 5 19 6 4 5 5 6